

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Nanoliposomas a partir de productos naturales infrautilizados
y residuos agroalimentarios como ingrediente funcional en
alimentos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Daniel Marín Peñalver

Directora

M. Pilar Montero García
M. Carmen Gómez Guillén
Ailén Alemán Pérez

Madrid

TESIS DOCTORAL

Madrid 2019

Nanoliposomas a partir de productos naturales infrautilizados y residuos agroalimentarios como ingrediente funcional en alimentos

Daniel Marín Peñalver

Directores: M. Carmen Gómez Guillén
M. Pilar Montero García
Ailén Alemán Pérez



INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
DE ALIMENTOS Y NUTRICIÓN



CONSEJO SUPERIOR DE
INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

CSIC



FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
DE ALIMENTOS Y NUTRICIÓN



CONSEJO SUPERIOR DE
INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Tesis Doctoral

NANOLIPOSOMAS A PARTIR DE PRODUCTOS NATURALES INFRAUTILIZADOS Y RESIDUOS AGROALIMENTARIOS COMO INGREDIENTE FUNCIONAL EN ALIMENTOS

Daniel Marín Peñalver

TUTOR: Elena Pérez-Urría Carril

Departamento de Fisiología Vegetal. Universidad Complutense de Madrid
(UCM)

DIRECTORAS: María Pilar Montero García

María del Carmen Gómez Guillén

Ailén Alemán Pérez

Grupo INNOVAPESCA. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición
(ICTAN). Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Madrid 2019



U N I V E R S I D A D
COMPLUTENSE
M A D R I D

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. _____
con número de DNI/NIE/Pasaporte _____, estudiante en el Programa
de Doctorado _____,
de la Facultad de _____ de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

y dirigida por: _____

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a ____ de _____ de 20____

Fdo.: _____

La Dra. María Pilar Montero García, la Dra. María del Carmen Gómez Guillén y la Dra. Ailén Alemán Pérez, del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN) adscrito al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),

Certifican:

Que la presente memoria titulada: “Nanoliposomas a partir de productos naturales infrautilizados y residuos agroalimentarios como ingrediente funcional en alimentos” ha sido realizada por el doctorando D. Daniel Marín Peñalver, bajo su dirección en las instalaciones del grupo INNOVAPESCA del ICTAN, y autorizan su presentación para la defensa de tesis y optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente en Madrid, a 16 de abril de 2019.

Dra. María Pilar Montero García

Dra. María del Carmen Gómez Guillén

Dra. Ailén Alemán Pérez

PROYECTOS ASOCIADOS A LA TESIS DOCTORAL

Esta tesis doctoral ha sido diseñada y llevada a cabo gracias a la financiación de distintos proyectos nacionales por parte del Ministerio de Economía y Competitividad, siendo dichos proyectos los mencionados a continuación:

- Proyecto INTRAMURAL-201370E036. “Aprovechamiento de subproductos pesqueros como fuente de nuevos productos”. 01/02/2013 – 31/01/2016.
- Proyecto AGL-2014-52825 (HALOFISH). “Aprovechamiento de plantas halófilas del litoral y “descartes” de la pesca para el diseño y desarrollo de productos pesqueros funcionales”. 01/01/2015 – 31/12/2028.
- Proyecto AGL-2017-84161-C2-1-R (NANOALIVAL). “Diseño de sistemas nanoparticulados a partir de residuos marinos y recursos vegetales alternativos para el desarrollo de alimentos dirigidos a la prevención de enfermedades”. 01/01/2018 – 31/12/2020.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quería agradecer a la Universidad Complutense de Madrid y, más concretamente, al Departamento de Fisiología Vegetal perteneciente a la Facultad de Ciencias Biológicas su compromiso con el programa de Doctorado en Biología, permitiéndome ampliar mi formación y conocimientos mediante el desarrollo de una tesis doctoral, con mención especial a la Dra. Elena Pérez-Urría Carril por su apoyo y consejo, no sólo como tutora de tesis sino también como amiga.

En segundo lugar, quería agradecer al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN) perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) la posibilidad brindada para desempeñar la tesis doctoral en sus instalaciones, así como a otros centros de investigación (Centro de Investigaciones Biológicas, CIB) o Unidades de Servicio (Unidad de Servicio de Técnicas Analíticas, USTA) los servicios prestados. Y aquí tiene lugar mi más sentido agradecimiento a las tres personas que realmente han hecho esto posible y que han estado ahí desde el primer día hasta el último, que depositaron su confianza en mí desde un principio y ésta no ha flaqueado en ningún momento. Por supuesto me refiero a mis directoras de tesis María Pilar Montero García, María del Carmen Gómez Guillén y Ailén Alemán Pérez. Gracias por permitirme realizar esta tesis doctoral bajo vuestra excepcional supervisión.

En tercer lugar, quería dar las gracias al Grupo INNOVAPESCA perteneciente al Departamento de Productos (ICTAN-CSIC) su fraternal acogida y enormes facilidades prestadas, las cuales han hecho mi estancia enormemente agradable. En este caso me refiero al Dr. Óscar Martínez Álvarez, la Dra. Elvira López Caballero, el Dr. Joaquín Gómez Estaca, Ignacio Escudero Abad, Alicia Sánchez Faure y Javier Dolz Martín, sin los cuales este proyecto no habría sido posible.

No me olvido de todas aquellas personas que trabajan en el ICTAN (y CIB) que en algún momento me han brindado su ayuda y de aquellas que temporalmente han pasado por los laboratorios del Grupo INNOVAPESCA durante mi estancia y que, de un modo u otro, han contribuido al desarrollo de esta tesis. Especial mención para Diego Taladrid Gandía y para Selene Pérez García, con quienes compartí intensas pero gratificantes mañanas y tardes de trabajo.

Por último, agradecer el incondicional apoyo recibido por parte de mis compañeros de piso, quienes entendieron perfectamente mis largas hibernaciones en mi habitación; de mis padres, que aun a día de hoy estarían dispuestos a pagarme otra carrera que no fuera Biología para no acabar el resto de mi vida en el paro; de mi hermano y mi cuñada, que siempre estuvieron ahí para lo que necesitase; del resto de mi familia y de incontables amigos (destacando a Cristian Mateo y David Lapuente, así como a Ernesto, María y Mónica en Madrid y a mis “hermanos” en Murcia), que han conseguido que esta larga y dura travesía que es el doctorado fuese un poco más amena gracias a su amistad y fidelidad. Muchas gracias a todos.

Mi tesis doctoral va dedicada a todos los nombrados anteriormente, y en especial a dos seres queridos que me abandonaron al comienzo de este camino. A mi abuela, Ana Conesa Ros, por todo el cariño que me dio, y a mi padrino, Juan Peñalver Conesa, que te fuiste demasiado pronto. Ojalá siguierais aquí para verme avanzar en la vida.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. ABSTRACT | 5 |
| 3. INTRODUCCIÓN | 9 |
| 3.1. Alimentos del siglo XXI | 11 |
| 3.2. Aprovechamiento de materias primas residuales | 12 |
| 3.2.1. Residuos de la acuicultura y la pesca | 13 |
| 3.2.2. Residuos agroalimentarios | 15 |
| 3.3. Encapsulación de compuestos bioactivos: liposomas | 17 |
| 3.3.1. Estabilización de liposomas | 23 |
| 3.3.2. Aplicaciones y regulación de la utilización de liposomas para alimentación | 24 |
| 3.3.3. Absorción de nutrientes | 26 |
| 3.4. Incorporación de liposomas en matrices alimentarias | 28 |
| 3.4.1. Incorporación en músculos de pescado | 29 |
| 3.4.2. Incorporación en películas comestibles | 32 |
| 3.5. Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> | 34 |
| 3.6. Técnicas experimentales | 36 |
| 4. HIPÓTESIS | 43 |
| 5. OBJETIVOS | 47 |
| 6. DISEÑO EXPERIMENTAL | 51 |
| 6.1. Purificación de fosfatidilcolina | 53 |
| 6.2. Estandarización de liposomas | 53 |
| 6.3. Extractos bioactivos procedentes de residuos | 53 |
| 6.4. Desarrollo de liposomas rellenos con bioactivos | 54 |
| 6.5. Absorción intestinal | 54 |
| 6.6. Aplicación en alimentos | 54 |
| 7. MATERIALES Y MÉTODOS | 59 |
| 7.1. Obtención de las materias primas | 61 |
| 7.2. Obtención de los extractos bioactivos | 61 |
| 7.3. Elaboración de liposomas | 62 |
| 7.4. Estabilización de liposomas | 63 |
| 7.5. Aplicación de liposomas en matrices alimentarias | 63 |
| 7.6. Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> | 64 |
| 7.7. Caracterización de materias primas | 65 |
| 7.8. Caracterización de extractos bioactivos | 67 |
| 7.9. Caracterización de liposomas | 69 |
| 7.10. Caracterización de homogeneizados y geles de músculo | 72 |
| 7.11. Caracterización de películas | 74 |
| 7.12. Caracterización de los productos de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> | 76 |
| 7.13. Actividades biológicas | 77 |
| 7.14. Análisis estadístico | 78 |
| 8. RESULTADOS | 79 |
| CAPÍTULO 1. PURIFICACIÓN DE FOSFATIDILCOLINA Y ESTANDARIZACIÓN DE LIPOSOMAS .. | 81 |
| 8.1. Efecto de la composición química y del proceso de sonicación en las propiedades de liposomas de lecitina de soja de grado alimentario con glicerol añadido | 83 |

| | |
|--|-----|
| CAPÍTULO 2. ENCAPSULACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS MEDIANTE LIPOSOMAS DE FOSFATIDIL COLINA DE LECITINA DE SOJA | 107 |
| 8.2. Encapsulación de compuestos procedentes de residuos alimentarios en liposomas de fosfatidilcolina de soja: efecto de la liofilización, estabilidad de conservación y aptitud funcional | 109 |
| 8.3. Encapsulación de extractos antioxidantes acuosos y etanólicos de hinojo marino (<i>Crithmum maritimum</i>) en liposomas de fosfatidilcolina de soja liofilizados | 131 |
| 8.4. Bioaccesibilidad y absorción intestinal <i>in vitro</i> de un extracto acuoso de hinojo marino (<i>Crithmum maritimum</i>) encapsulado en liposomas de fosfatidilcolina de soja | 147 |
| CAPÍTULO 3. APLICACIÓN DE LIPOSOMAS EN PRODUCTOS REESTRUCTURADOS | 155 |
| 8.5. Agregación proteica, agua ligada y gelificación térmica de músculo de merluza homogeneizado con sal en presencia de liposomas de fosfatidilcolina de soja con glicerol sometidos a diferentes tratamientos de estabilización | 157 |
| 8.6. Agregación proteica, agua ligada y gelificación térmica de músculo de merluza de baja calidad funcional homogeneizado con sal en presencia de liposomas de fosfatidilcolina de soja con trealosa sometidos a congelación-descongelación y liofilización | 177 |
| 8.7. Liposomas de fosfatidilcolina liofilizados encapsulando varios extractos antioxidantes a partir de residuos naturales como ingredientes funcionales en geles de surimi | 191 |
| CAPÍTULO 4. APLICACIÓN DE LIPOSOMAS EN PELÍCULAS COMESTIBLES | 213 |
| 8.8. Cambios en la integridad estructural de las películas de caseinato de sodio mediante la adición de nanoliposomas que encapsulan una fracción péptidica activa de langostino (<i>Penaeus notialis</i>) | 215 |
| 8.9. Películas de carboximetilcelulosa conteniendo nanoliposomas encapsulando un hidrolizado de colágeno con capacidad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina | 227 |
| 9. DISCUSIÓN INTEGRADORA | 237 |
| 9.1. Materias primas | 239 |
| 9.1.1. Residuos agroalimentarios y pesqueros | 239 |
| 9.1.2. Propiedades saludables y/o bioactivas | 239 |
| 9.1.3. Lecitina y fosfatidilcolina | 240 |
| 9.1.4. Extractos bioactivos | 242 |
| 9.2. Liposomas | 246 |
| 9.2.1. Dispersiones liposomales vacías | 247 |
| 9.2.2. Dispersiones liposomales rellenas | 248 |
| 9.3. Estabilización de liposomas | 254 |
| 9.3.1. Liposomas vacíos | 254 |
| 9.3.2. Liposomas rellenos | 260 |
| 9.4. Absorción intestinal | 273 |
| 9.5. Aplicación de liposomas en reestructurados de pescado | 274 |
| 9.5.1. Importancia del estado de hidratación de los liposomas | 274 |
| 9.5.2. Importancia del estado de agregación del músculo y del protector incorporado en los liposomas | 277 |
| 9.5.3. Geles de pescado formulados con liposomas encapsulando bioactivos | 287 |
| 9.6. Aplicación de liposomas en películas comestibles | 290 |

| | |
|---|-----|
| 9.7. Evaluación de las posibles Declaraciones nutricionales de las formulaciones con liposomas..... | 293 |
| 10. CONCLUSIONES | 299 |
| 11. BIBLIOGRAFÍA | 303 |
| 12. ANEXO | 331 |

1. RESUMEN

Título de la tesis: Nanoliposomas a partir de productos naturales infrautilizados y residuos agroalimentarios como ingrediente funcional en alimentos

Los liposomas son vesículas esféricas coloidales, formadas por una bicapa lipídica de fosfolípidos englobando un núcleo acuoso, lo que le confiere carácter anfipático, y la posibilidad de incorporar bioactivos de diferente composición y naturaleza, con propiedades funcionales. Su tamaño nanométrico y similitud con las membranas biológicas, les permite atravesar eficazmente las células intestinales, protegiendo al bioactivo e incorporándolo al torrente sanguíneo. El uso de materias primas infrautilizadas o desechadas por la industria alimentaria garantiza el carácter natural de los liposomas, así como el bajo coste del producto final, dándole un uso integral a dichas materias primas. Su composición, rica en ácidos grasos insaturados, les confiere un carácter de ingrediente saludable. La protección de compuestos activos/bioactivos mediante la encapsulación de los mismos para mantener por más tiempo, tras el procesado e ingesta, la actividad biológica es un mecanismo de gran interés. La encapsulación en nanoliposomas es un ejemplo de ello. El objetivo de este proyecto, fue la obtención de nanoliposomas basados en productos naturales infrautilizados y residuos de la industria agroalimentaria, para su aplicación como ingrediente alimentario, de acuerdo a su reciente inclusión en la definición de nuevo alimento según el Reglamento Europeo (nº 2015/2283).

Para llevarlo a cabo, inicialmente se estandarizó el proceso de preparación de liposomas en función de la materia prima encapsulante (lecitina de soja y fosfatidilcolina de soja parcialmente purificada mediante procesos de lavados sucesivos, 2 y 5) y del método de sonicación (fuerte y prolongado o débil y corto), así como de la presencia o ausencia de un estabilizador de vesículas como es el glicerol. Seleccionada la preparación liposomal más conveniente (con fosfatidilcolina purificada mediante 5 lavados y método de sonicación con elevada amplitud y tiempo prolongado, en presencia de glicerol), se procedió a la extracción y encapsulación en liposomas de varios extractos bioactivos de diferente naturaleza y composición: un hidrolizado peptídico procedente de colágeno de tónicas y pieles del calamar gigante *Dosidicus gigas*, una fracción peptídica <1 kDa procedente del langostino *Penaeus notialis*, un extracto polifenólico procedente de piel y albedo del fruto de la granada *Punica granatum*, dos extractos polifenólicos (uno acuoso y otro etanólico) procedentes de tallos y hojas de la planta de hinojo marino *Crithmum maritimum*, y un extracto lipídico rico en astaxantina procedente de bioresiduos (cefalotórax, cutícula, parápodos, pleópodos y telson) del langostino *Litopenaeus vannamei*.

Las correspondientes dispersiones liposomales mostraron adecuadas propiedades de partícula, con vesículas esféricas de tamaño nanométrico comprendido entre 89,5-150,1 nm; una distribución de tamaños monomodal con una polidispersidad de 0,186-0,370; un potencial de membrana entre -27,7 y -53,9 mV; y una eficacia de encapsulación del 52,4-82,9 %, parámetros que varían en función del tipo de extracto y de la concentración de bioactivo incorporada.

Se aplicaron diversos métodos de estabilización de nanoliposomas, que permitieron alargar la vida útil de los mismos, como altas presiones, congelación, atomización o liofilización. Cuando las vesículas fueron sometidas a congelación/descongelación o a congelación/liofilización fue necesaria la presencia de un crioprotector, como el glicerol; o de un lioprotector, como la trealosa. Las dispersiones liposomales rellenas se estabilizaron mediante liofilización. El proceso de liofilización incrementó la estabilidad de todos los liposomas (reflejado por el potencial de membrana más electronegativo y el aumento de la eficacia de encapsulación), así como el rango de tamaños hasta 171,1-372,9 nm y la polidispersidad hasta 0,279-0,430, con distribuciones bi- y trimodales, igualmente dependientes del tipo de extracto bioactivo y la concentración del mismo. Los liposomas liofilizados rellenos con los diversos extractos bioactivos, mostraron una consistencia de pasta untuosa (atribuida al glicerol), una alta estabilidad física y térmica, y una ligera susceptibilidad a la oxidación, dada su composición rica en ácidos grasos poliinsaturados. Los extractos bioactivos estuvieron eficientemente encapsulados y, por tanto, poco disponibles

para proteger al liposoma de la oxidación, como demostró el estudio de las actividades antioxidantes de los liposomas. De este modo, la actividad potencial de los bioactivos se presupone intacta hasta que el liposoma llegue al interior del organismo.

Para comprobar su comportamiento tras la ingesta, se llevó a cabo un estudio de absorción intestinal *in vitro*, a través de una monocapa de células Caco-2, de extractos y liposomas previamente digeridos. La permeabilidad intestinal del ácido clorogénico presente en el extracto acuoso de hinojo fue limitada, tanto para el extracto libre como encapsulado en liposomas. Por otro lado, se pudo observar que los liposomas resistieron la digestión gastrointestinal.

Los nanoliposomas pueden constituir un ingrediente funcional, incluso con alegaciones alimentarias. Entre otras posibilidades, pueden ser incorporados en matrices alimentarias, dando lugar a nuevos productos funcionales con un alto valor añadido, los cuales ofrecen una amplia variedad de aplicaciones. Para evaluar su comportamiento en diferentes matrices, se procedió a desarrollar diferentes sistemas modelo. Por un lado, se incorporaron liposomas en miosistemas de músculo de merluza fresca y de surimi de calamar, obteniéndose geles con mayor agregación proteica, mayor capacidad de retención de agua y estabilidad térmica, así como con propiedades visco-elásticas y mecánicas diferentes. La calidad inicial de la proteína del músculo, así como el estado de hidratación de los liposomas, fueron dos de los factores más determinantes en las propiedades finales de dichos geles. Por otro lado, se incorporaron liposomas en polímeros naturales (caseinato sódico y carboximetilcelulosa sódica), obteniéndose películas comestibles con una mayor adherencia y mucoadhesividad, con una buena integridad estructural y adecuadas propiedades organolépticas. En función de las propiedades físicas particulares de cada película, éstas podrían ser utilizadas bien como alimento en sí mismo, o bien como recubrimiento de otros alimentos. Formulaciones alternativas, tanto de geles como de películas biopoliméricas, demostraron la importancia de las cápsulas (nanoliposomas) en las características finales de los productos, y en la protección de la actividad biológica de los compuestos encapsulados, evitando la interacción directa de éstos con las matrices y su posible degradación durante el procesado.

2. ABSTRACT

Title of the thesis: **Nanoliposomes from underutilized natural products and agro-wastes as a functional ingredient in foods**

Liposomes are colloidal spherical vesicles formed by an aqueous core surrounded by a lipid bilayer of phospholipid, which confer them an amphipathic character, and the capacity to incorporate inside bioactives of different composition and nature, with functional properties. Their nanometric size and similarity with the biological membranes would let them to cross efficiently through intestinal cells protecting the bioactive, which would be incorporate to the bloodstream. The use of underutilized or waste raw materials from the food industry guarantee the natural character of the liposomes and the low cost of the final product, contributing to the integral use of the raw materials. Its composition, rich in unsaturated fatty acids, confirms a healthy ingredient character. A very interesting mechanism to keep the biological activity of the active/bioactive compounds for more time after the processed and the intake is their protection through the encapsulation process. The encapsulation in nanoliposomes is an example. The objective of this project was the obtaining of nanoliposomes based on underutilized natural products and wastes, to their application as food ingredient, according to the recent inclusion of liposomes in the definition of new food into the European Regulation (nº 2015/2283).

First, the process of nanoliposomes preparation was standardized in function of the encapsulant raw material (soybean lecithin and purified partially soybean phosphatidylcholine) through successive washing steps (2 o 5), the sonication method (strong and long or weak and short) and the presence or absence of a stabilizer of vesicles like as the glycerol. After choosing the five-times purified phosphatidylcholine, with a strong and long sonication method, in presence of glycerol (L5A) as the liposomal formulation suitable, various bioactive extracts of different nature and composition were extracted and encapsulated in liposomes: a peptide hydrolysate of collagen from tunics and skin of giant squid *Dosidicus gigas*, a peptide fraction <1 kDa from shrimp *Penaeus notialis*, a polyphenolic extract from peel and albedo of pomegranate *Punica granatum*, polyphenolic extracts (one aqueous and other ethanolic) from stems and leaves of sea fennel *Crithmum maritimum*, and a lipid extract rich in astaxanthin from bio-wastes (cephalothorax, cuticles, parapodos, pleopods and telson) of shrimp *Litopenaeus vannamei*.

The liposomal dispersions presented proper particle properties, with nanometric spherical vesicles among 89,5-150,1 nm, a monomodal size distribution with a polydispersity among 0,186-0,370, a membrane potential among -27,2 and -53,9 mV, and an entrapment efficiency range of 52,4-82,9 %. All parameters changed in function of the type of extract and the bioactive concentration.

Some stabilization methods were applied on liposomes to extend their useful life, such as high pressure, freezing, atomization or lyophilisation. The addition of a crioprotector as glycerol or a lioprotector as trehalose is necessary when liposomes are submitted to a freeze/thaw or a freeze/dry process. The filled liposomal dispersions were stabilized by lyophilisation. Lyophilisation increased the stability (reflected by a more electronegative membrane potential and by the increase of entrapment efficiency), the size (171,1-379,9 nm) and the polydispersity (0,279-0,430, with bi- and trimodal distributions) of all liposomes. As dispersions, parameters of freeze-dried liposomes were depended of the type of extract and the bioactive concentration. The freeze-dried liposomes loaded with different bioactive extracts showed a smeary and gluey consistence (attributed to the glycerol), a high physic and thermic stability, and a slight susceptibility to oxidation, since their composition rich in polyunsaturated fatty acids. The bioactive extracts were little available to protect the liposomes against oxidation, as demonstrated the study of antioxidant activity, because they were efficiently encapsulated. On this way, the potential activity of bioactives it is assumed intact until the liposome reaches the organism.

Based on the above, a study of intestinal absorption was carried out for extracts and digested liposomes through the simulation of a monolayer of Caco-2 cells. The intestinal permeability of the chlorogenic acid present in the aqueous extract of fennel was limited, both for the free extract and encapsulated in liposomes, which were resistant to digestion.

Nanoliposomes can be a functional ingredient, even with food claims. Besides, liposomes have the possibility to be incorporated into a food matrix, obtaining new functional products with high value added useful for a wide variety of applications. I was evaluated the behaviour of liposomes into various model systems. On the one hand, liposomes were incorporated into fresh hake muscle and into squid surimi, obtaining gels with higher protein aggregation, higher water holding capacity, higher thermic stability and different elastic and mechanical properties. Both, the initial quality of muscle protein as the hydration state of liposomes, were two determinant factors on the final properties of the gels. On the other hand, liposomes were included into biopolymers (sodium caseinate and sodium carboxymethylcellulose), obtaining edible films with higher adherence and mucoadhesiveness, a good structural integrity and proper organoleptic properties. According to the particular physical characteristics, films can be used as direct food or as covering of other food. Alternative formulations of gels and biopolimerics films demonstrated the importance of capsule (liposome) over final properties of matrix and on the protection of biological activity of encapsulated compound, avoiding the direct interaction between the bioactive and the matrix and it possible degradation during the processing.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Alimentos del siglo XXI

La población actual dispone cada vez de menos tiempo para alimentarse, principalmente debido a los extensos horarios de trabajo y al gran abanico de posibilidades de ocio que ofrecen las ciudades modernas. Por ello, los consumidores actuales demandan alimentos de rápida preparación y consumo, que limite el tiempo empleado en preparar la comida y deje más tiempo disponible para otras actividades. Estos productos deben ser versátiles, tanto para procurar una comida apetitosa en casa, a la vez que permita, en ocasiones, tomar los alimentos de una forma más rápida y cómoda, incluso a la vez que realizan un trayecto ya sea a pie o en transporte público, pero no por ello que pierdan sus propiedades de comida saludable y apetitosa. Del mismo modo, estos productos deben llegar a otros sectores de la población, como es el caso de las personas de elevada edad, cada día más numerosas. Este sector también precisa, dadas sus limitaciones tanto motrices como cognitivas, de alimentos de rápida y sencilla preparación y fácil consumo, siempre manteniendo sus propiedades saludables.

Como respuesta a esta demanda, se ha promovido en las últimas décadas el desarrollo y comercialización de productos alimentarios de fácil y rápida preparación y consumo. Este hecho no implica que su procesamiento también tenga que ser rápido y sencillo necesariamente. De hecho, existen tanto alimentos poco procesados, como *sushi*, *sashimi*, vegetales de cuarta gama, etc., como alimentos con un alto grado de procesamiento en el que son necesarias diversas tecnologías para su producción, conservación y envasado. Entre los alimentos altamente procesados se encuentran los embutidos, los reestructurados de carne y pescado, purés, así como cualquier tipo de preparados complejos constituidos por mezclas de otros, etc. Además, la tendencia de utilización de este tipo de productos continúa creciendo con los años, ampliando las variedades y posibilidades que ofrecen, y adecuándose a los diferentes requisitos según las poblaciones de consumidores. A día de hoy podemos encontrar productos tan variados como frutas y vegetales desecados, comidas elaboradas listas para su consumo inmediato o envases inteligentes capaces de mantener estables determinadas condiciones de humedad, temperatura, oxígeno, etc. y/o que facilitan su conservación en óptimas condiciones.

Paralelamente, la sociedad del siglo XXI ha experimentado un cambio de mentalidad con respecto a épocas anteriores y actualmente está mucho más concienciada en que debe de mantener una alimentación sana y equilibrada, con el fin de evitar o reducir el riesgo de padecer enfermedades de gravedad media como la obesidad o la diabetes, y otras más graves como son las enfermedades cardiovasculares o neurodegenerativas, todas ellas asociadas directamente con la alimentación. Para conseguir este tipo de alimentación es necesaria la ingesta de una determinada serie de compuestos o nutrientes esenciales.

Este tipo de productos constituyen lo que se conoce como “alimentos funcionales”, que surgieron por primera vez en Japón en los años 80. Posteriormente, en 1991 el Ministerio de Salud y Bienestar de Japón lanzó la reglamentación para los “Alimentos para uso específico de salud” o “Food for specified health use” (FOSHU). En 1994 la American Dietetic Association (ADA) apoyó el término de alimentos funcionales y un año después, en 1995, se celebró la primera Conferencia Internacional sobre perspectivas Oriente-Occidente de los alimentos funcionales con la finalidad de unificar los conceptos. En aquellos años la población japonesa ya era realmente longeva y evitar el tratamiento de ciertas enfermedades crónicas con fármacos, a través de una alimentación equilibrada, con alimentos funcionales resulta un reto saludable y económico de gran relevancia.

Un “alimento funcional” es aquel que desempeña una función favorable y específica en la fisiología del organismo, yendo más allá de su contenido nutricional. Para que sea considerado funcional es importante que la acción que desempeñe sobre el organismo sea beneficiosa, mejorando el estado de salud y bienestar, pudiendo reducir el riesgo de padecer enfermedades.

Recientemente, Volpe y Solis (2015) definen alimento funcional como aquel alimento que contiene sustancias que proveen beneficios médicos o de salud y nutracéuticos.

Dado el modo de vida actual mencionado anteriormente, no siempre es fácil tomar alimentos que contengan toda esta gama de nutrientes y por ello la alimentación puede no ser completamente adecuada. En base a estas deficiencias, hay una creciente tendencia por parte de las industrias y mercados en la producción y venta de productos enriquecidos con vitaminas, péptidos y otros nutrientes.

3.2. Aprovechamiento de materias primas residuales

Según el Ministerio del Medio Ambiente, Medio Rural y Marino de España, en la actualidad se generan grandes cantidades de restos y residuos variados en su composición y naturaleza. Una de las preocupaciones actuales es el aprovechamiento integral de estos recursos industriales y su manejo sostenible, que abarca la explotación de los recursos y también el mantenimiento de su potencial en el futuro, así como la utilización de subproductos y residuos generados (Arancibia, 2014). Estas industrias generan, a través de los residuos, una importante fuente de contaminación que desencadena graves perjuicios sobre el ecosistema. Actualmente, existen diversos Planes y Programas a nivel estatal y europeo destinados a reducir la cantidad de residuos generados, como es el Programa Estatal de Prevención de Residuos 2014-2020, englobado dentro de la Estrategia 2020 de la Unión Europea (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2013), o el Plan Estatal Marco de Gestión de Residuos (PEMAR) 2016-2022 (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2015). Una de las estrategias propuestas por la Unión Europea (aún en elaboración en España) fue el Paquete de Economía Circular, presentado por la Comisión Europea en diciembre de 2015 (Comisión Europea, 2015). La economía circular plantea la gestión de los residuos como un sistema de retroalimentación basado en las 3R (reducir, reciclar y reutilizar), donde se maximicen los recursos disponibles y se reduzca la generación de residuos. Esta estrategia busca cambiar del actual modelo lineal de producción-consumo-eliminación (modelo agresivo con el medio que agotará las fuentes de suministro) por un modelo circular de producción-consumo-reciclaje-materias primas secundarias.

Con independencia de los problemas medioambientales planteados, los productos infrautilizados, subproductos y residuos representan una cantidad considerable de material potencialmente reutilizable y una fuente importante de energía. Gran parte de los residuos generados en la industria, específicamente en la industria agraria y alimentaria (conocidos como bioresiduos), tienen como principal destino, cuando se usan para reciclar, la alimentación animal o el biodiesel. No obstante, bien podrían emplearse como sustratos y nutrientes para dar lugar a productos para consumo humano, con la mejora económica y social que ello produciría. El desarrollo de nuevas aplicaciones tecnológicas contribuye en gran medida a reducir la emisión de residuos contaminantes y a su utilización de forma rentable, dando lugar a la obtención de productos de alto valor añadido (Arancibia, 2014).

El empleo de estos residuos y subproductos como materias primas garantiza un beneficio medioambiental, ya que las fuentes infrautilizadas no se acumulan y los descartes no necesitan ser eliminados (con el proceso industrial y problemas medioambientales que ello conlleva), siendo todas estas materias revalorizadas y aprovechadas para un uso integral de las mismas. Este hecho permitiría reducir aún más los costos del producto final, pues se parte de materias primas totalmente disponibles sin ningún coste adicional por su obtención, lo que junto con su capacidad para elaborarse en grandes cantidades (a nivel industrial) pueden dar lugar a un producto de bajo coste accesible a cualquier tipo de consumidor. Es cierto que a veces el proceso de extracción del co-producto, por su complejidad, requiere de una implementación industrial paralela, y ésta puede ser la causa de que en ocasiones no llegue a ser una realidad a nivel industrial. Es por ello que los procesos de extracción deben ser económicos, y sobre todo

respetuosos con el medio ambiente, a la vez que debería contemplar un sistema de reutilización y reciclado de reactivos.

El hecho de que se empleen materiales que no se usan habitualmente o que se consideran residuos de la industria, no significa que no tengan propiedades que puedan ser de beneficio para la salud, ni mucho menos que sean perjudiciales para ella. Generalmente, se descarta la utilización de estos residuos debido a que no tienen valor comercial y no tienen rentabilidad por sí mismos, despreciando su reutilización. Sin embargo, la mayoría de estas materias primas poseen propiedades interesantes, que podrían y deberían ser explotadas y aprovechadas y que, si se combinan de la manera adecuada, pueden dar lugar a productos de alto valor añadido o co-productos (Sayari et al., 2016), es decir, productos secundarios que se generan durante un proceso productivo y que pueden alcanzar un valor igual o mayor que el producto principal, y subproductos o productos derivados que pueden aportar un beneficio mayor que el de meros residuos.

3.2.1. Residuos de la acuicultura y la pesca

La industria dedicada al procesamiento de productos pesqueros genera una gran cantidad de residuos correspondiente al 30-50 % del peso inicial, tales como espinas, pieles, escamas, vísceras, cabezas y restos de músculo (Gumisiriza et al., 2009). Estos residuos constituyen una destacada fuente de proteínas, lípidos, minerales, vitaminas, etc., parte de los cuales se emplean habitualmente para alimentación animal y como fertilizantes; mientras que la parte que no se aprovecha contribuye a incrementar la contaminación ambiental (Arvanitoyannis & Kassaveti, 2008). En los últimos años se han desarrollado estrategias para el aprovechamiento de los residuos de pescado y de marisco, con la obtención de productos de alto valor comercial destinados a la alimentación humana, tales como productos reestructurados a partir de restos de músculo; colágeno y gelatina a partir de escamas, pieles y espinas; quitosano a partir de caparazones de crustáceos; lípidos y proteínas procedentes de vísceras; e hidrolizados y péptidos bioactivos (Giménez et al., 2012).

Recientemente, acorde a López-Caballero et al. (2013), hay un creciente interés en el aprovechamiento de descartes procedentes de la industria del pescado, pues constituyen una importante fuente de péptidos bioactivos con diversas propiedades, tales como propiedades antioxidantes y antihipertensivas (Cudennec et al., 2008; Alemán et al., 2010). Los recortes y restos de músculo desaprovechados, normalmente adheridos a espinas o huesos, constituyen aproximadamente el 20 % de la proteína muscular, que corresponde a la parte más valorada del pescado. Aproximadamente el 30 % de los desechos pesqueros corresponden a tejido conectivo, en cantidad variable según especies, con un contenido en colágeno superior al 95 % del total de proteína (López-Caballero et al., 2013). Por tanto, existe una gran cantidad de colágeno procedente de las industrias del procesamiento de pescado que es desaprovechado, con diferentes propiedades según especies. Entre las alternativas de destino se encuentran su aplicación en medicina y cosmética por su poder regenerador de tejidos como dermis, cartílago y tejido conectivo, así como su capacidad de formar hidrogeles y películas con posibilidad de aplicación como prótesis, apósitos, etc. Hay que mencionar que actualmente se vende en los supermercados colágeno hidrolizado en forma de polvo comestible con la finalidad de fortalecer huesos, cartílagos y piel. Una de las más importantes fuentes de colágeno procede de uno de los calamares neotónicos más grandes (*Dosidicus gigas*), cefalópodo cuyo manto está dispuesto en una capa de tejido muscular intercalado entre dos túnicas de tejido conectivo (Dublán, 2006). Estas túnicas son estructuras ricas en colágeno tipo I (Figura 1), principal constituyente del tejido conectivo cuya función es la conexión entre varias células.

La gelatina es un derivado procedente de la desnaturalización e hidrólisis térmica de la triple hélice de colágeno, el cual habitualmente se somete a un pretratamiento ácido o alcalino moderado para favorecer un hinchamiento de la molécula mediante el desdoblamiento y rotura

de enlaces no covalentes, y predisponiéndola para la solubilización posterior durante el tratamiento térmico mediante la desestabilización de la triple hélice de colágeno por rotura de enlaces covalentes, obteniendo así la gelatina. La gelatina es un compuesto proteico soluble en agua, fácilmente digerible utilizado como ingrediente para mejorar la elasticidad, consistencia y estabilidad de alimentos. Además, su empleo para encapsulación o formación de películas le hace interesante desde el punto de vista de las industrias farmacéuticas, cosméticas y alimentarias y es especialmente característico por sus propiedades de hidrogel en frío y reversible.

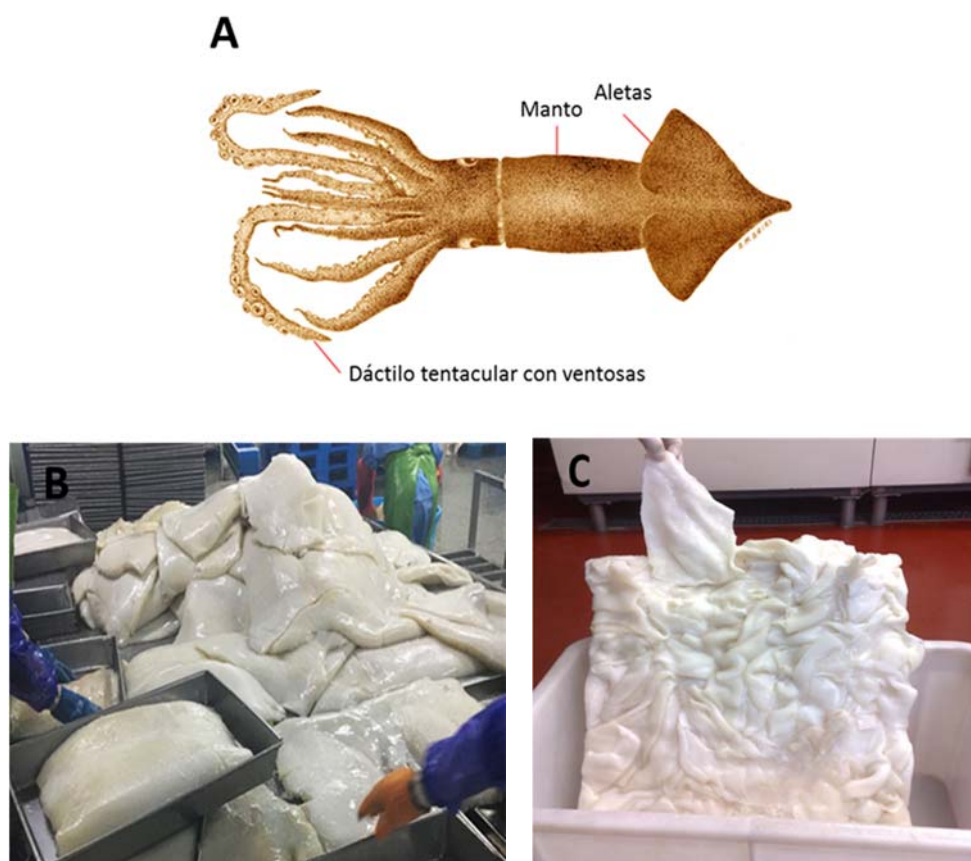


Figura 1. A) *Dosidicus gigas*. B) Manto del calamar gigante *Dosidicus gigas*. C) Residuos de túnicas con restos de musculo adherido procedente del procesado de surimi.

Otra de las fuentes aprovechables son los hidrolizados y péptidos bioactivos obtenidos a partir de la hidrólisis enzimática de los componentes proteicos. Por ejemplo, los hidrolizados de colágeno a partir de descartes de calamar, como pieles y túnicas, son especialmente interesantes por no presentar pigmentos que puedan conferir coloraciones indeseables. Estos hidrolizados son conocidos por sus actividades antioxidantes, antihipertensivas y anticancerígenas (Alemán et al., 2010; Alemán et al., 2011b). Existen otros casos en los que una materia prima no es descartada o infrautilizada en fresco, sin embargo, ésta pierde su valor comercial, principalmente debido a su excesivo y prolongado tiempo de conservación en la industria, hecho relativamente frecuente en alimentos conservados en estado congelado. Este tipo de productos continúan manteniendo gran parte de su potencial bioactivo, aunque sus propiedades tecno-funcionales y características sensoriales se vean mermadas, pudiendo ser también aprovechados y revalorizados.

Otro de los residuos apenas explotado procedente de este sector industrial son los caparazones de crustáceos (especialmente cabezas o cefalotórax) que representan un 40-50 % del peso total

de residuos sólidos. Es un hecho que en España y en países del mediterráneo se comercializa entero, no obstante, cada vez son más numerosas las preparaciones donde se procesa ya pelado, y en otros muchos países Europeos, como por ejemplo en Alemania, lo más común es comercializarlo totalmente pelado y solo las especies de gran tamaño se pueden vender solo sin cabezas. Por ello, el volumen de residuos de caparazones y cabezas o cefalotórax es muy grande, y generalmente se centralizan en las industrias procesadoras. Estos residuos constituyen un problema medioambiental y una fuente potencial de agentes patógenos. Sin embargo, también suponen una oportunidad comercial, tanto para alimentación animal como para consumo humano (Arancibia, 2014). A partir de estos desechos se pueden obtener determinados extractos de grasa de crustáceo que constituyen una mezcla heterogénea de componentes de interés, entre los que destacan ácidos grasos, colesterol, proteínas, minerales, antioxidantes (α -tocoferol) y pigmentos (astaxantina). De este modo, los bioresiduos (cutículas y cefalotórax) de langostino (*Litopenaeus vannamei*) (Figura 2) poseen propiedades antioxidantes atribuidas a compuestos antioxidantes como α -tocoferol o astaxantina (Gómez-Estaca et al., 2016) y a los beneficios derivados de su elevado contenido en ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (ácido docosahexaenoico y ácido eicosapentaenoico). Como residuo de este proceso de extracción a su vez, permanecen los exoesqueletos formados por proteína, quitina y minerales, a partir de los cuales pueden ser extraídos estos compuestos. Posteriormente, de la quitina por desacetilación puede ser obtenido el quitosano (Arancibia et al., 2015), polisacárido con múltiples funciones sobre el organismo, siendo algunas de las más destacadas su poder antimicrobiano, comportamiento antioxidante, propiedades texturizantes, regulador de la movilidad intestinal, agente hipocolesterolémico o actividad inmunológica. Por otro lado, los productos derivados de las vísceras de pescado pueden consistir en proteínas, lípidos con una composición rica en ácidos grasos poliinsaturados, enzimas con propiedades biológicas, etc. (López-Caballero et al., 2013).



Figura 2. Langostino *Litopenaeus vannamei* y sus residuos (cutículas y cefalotórax).

3.2.2. Residuos agroalimentarios

Otro sector que genera enormes cantidades de desechos potencialmente aprovechables es el agroalimentario, siendo una de las principales preocupaciones actuales la explotación integral de los recursos agrícolas y su manejo sostenible (Day et al., 2014). Entre estos residuos destacan los procedentes de plantas y, más concretamente, de sus frutos, que atribuido a su composición, poseen una elevada capacidad antioxidante (Okogoni et al., 2007).

Uno de estos residuos lo constituyen las cáscaras, es decir las pieles y albedos del fruto de la granada (*Punica granatum*). Este fruto, originario de Oriente Medio, es muy consumido en los últimos años por sus propiedades antioxidantes y porque se considera una importante fuente de compuestos bioactivos potencialmente saludables (Mirdehghan & Rahemi, 2007). Entre los compuestos bioactivos de la granada destacan los polifenoles, compuestos fenólicos del metabolismo secundario de plantas. Existen tres grandes grupos de polifenoles: flavonoides, taninos y ligninas, siendo el más destacado y numeroso los flavonoides. Dentro de este grupo se encuentran las antocianinas, flavanoles, flavanonas, flavonoles, flavonas e isoflavonas

(Dashwood, 2007). Se le atribuyen otras propiedades como la prevención de enfermedades asociadas al estrés oxidativo, de enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas o cáncer, así como la función de regular enzimas y receptores (Manach et al., 2004).

Cada vez es más frecuente la elaboración de zumos de granada a nivel industrial y, por tanto, la producción de pieles y albedo como residuos, por lo que el estudio de su composición y potencial de utilización es de gran interés. La piel y albedo de granada (Figura 3) tiene cierta dureza y amargor pero presenta una excelente actividad antioxidante y antiproliferativa (Masci et al., 2016). La piel de granada es un bioresiduo muy rico en polifenoles, destacando el ácido elágico, ácido gálico, galotaninos y elagitaninos (taninos hidrolizables) como compuestos principales. Estos cuatro polifenoles mayoritarios poseen actividades antioxidante, antiinflamatoria, antitirosinasa y antimutagénica, todas ellas en beneficio de la salud (Tokton et al., 2014). Su actividad principal es la antioxidante, gracias a su efecto de supresión del pardeamiento de la pigmentación de la piel inducido por la luz ultravioleta. Esta actividad antioxidante está directamente relacionada con su composición rica en polifenoles, entre los que destaca la punicalagina como el polifenol más abundante (Tabaraki et al., 2012). Otro componente residual es el albedo que también tiene propiedades saludables y no disminuye la aceptación del producto (Vázquez-Araújo et al., 2011). El que este tipo de materiales se hayan desechado hasta hace pocos años atrás se considera que podría haber sido debido al desconocimiento de sus propiedades funcionales. Sin embargo, en la última década ha crecido el interés en el uso de este tipo de materiales, sobre todo en la industria de la cosmética, donde se utilizan debido a sus múltiples funciones beneficiosas sobre la piel. De hecho, se observó que la piel de granada tiene incluso mayor poder antioxidante que la pulpa del fruto (Okogoni et al., 2007).



Figura 3. Piel y albedo de granada (*Punica granatum*).

Otra fuente infrautilizada dentro del ámbito agroalimentario es el hinojo marino (Figura 4). El hinojo marino (*Crithmum maritimum*) es una planta halófila muy abundante en las costas cantábrica y atlántica septentrional (Knees, 2003). Constituye una planta infrautilizada (Renna et al., 2017) cuyo cultivo comercial aún no ha sido explotado a nivel global (Pavela et al., 2017), aunque existen empresas a nivel nacional que lo comercializan, como planta fresca (Porto Muiños S.L. (A Coruña) o en tarros de conserva (Sa Llubinera S.L. (Menorca) y Mel i Untis (Menorca). El hinojo marino es rico en compuestos con una destacada actividad antioxidante (Siracusa et al., 2011). Los principales compuestos bioactivos del hinojo marino son fenoles simples como el ácido clorogénico. Este ácido tiene una función de defensa frente a microorganismos, lo que demuestra ser útil contra bacterias Gram positivas (Senatore et al., 2000). También se le atribuyen propiedades antivirales y antiinflamatorias. Sin embargo, lo que hace interesante a esta molécula es su capacidad antioxidante (Meot-Duros & Magne, 2009).

De los muchos residuos existentes, se han seleccionado para el presente trabajo aquellos considerados de mayor interés por su naturaleza peptídica procedente de colágeno marino (hidrolizado de calamar), polifenólica procedente del sector agrario (piel-albedo de granada e hinojo marino) y lipídica procedente de crustáceos (bioresiduos de langostino).



Figura 4. Planta de hinojo marino (*Crithmum maritimum*) tal y como se distribuye comercialmente en fresco.

3.3. Encapsulación de compuestos bioactivos: Liposomas

Los compuestos bioactivos, incluyendo los procedentes de residuos o especies infrautilizadas, podrían ser utilizados como nutraceuticos en alimentación humana. Sin embargo, presentan el inconveniente de que, dado su estructura y composición, son muy susceptibles de ser inactivados o degradados física y químicamente como consecuencia de las condiciones ambientales, el transcurso del tiempo, su interacción con otros componentes o incluso por los procesos de digestión cuando éstos son ingeridos y transportados por el organismo. Además, en algunas ocasiones pueden presentar otros inconvenientes como baja solubilidad, pobre biodisponibilidad o atributos sensoriales desagradables, no siendo adecuada su incorporación directa en otros alimentos (Livney, 2015). Por tanto, son necesarias estructuras que protejan al bioactivo y permitan que su actividad y propiedades beneficiosas asociadas queden posteriormente biodisponibles para el organismo, a la vez que se mejoran las propiedades de solubilidad y aceptación sensorial, entre otras. Existen multitud de estrategias para proteger a estos compuestos, siendo una de las más rentables, eficaces y empleadas en las últimas décadas la técnica de microencapsulación.

La microencapsulación es una tecnología que permite incorporar determinadas sustancias bioactivas en una estructura vesicular que las recubre con el objetivo de proteger la bioactividad y propiedades beneficiosas de la sustancia dentro de esta estructura (Ye et al., 2018). Dadas las posibilidades que este tipo de estructuras ofrecen, nuestro producto alimenticio funcional estará basado en nanoencapsulados, pues de todos los métodos de microencapsulación descritos, la nanoencapsulación es la que presenta mejores características y un mayor potencial de aplicación dado precisamente el pequeño tamaño de las vesículas obtenidas con este método (Prakash et al., 2018), lo que facilita su incursión entre los tejidos y células del organismo. Dentro de la nanoencapsulación existen diversas estructuras capaces de proteger a los bioactivos, que de manera esquemática se representan en la figura 5.

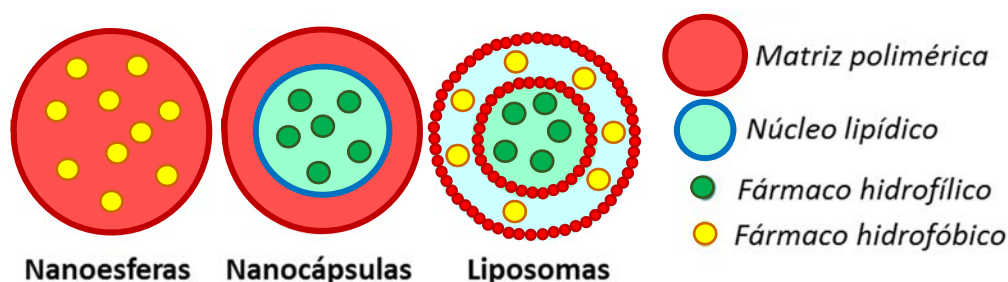


Figura 5. Métodos de nanoencapsulación.

La más eficiente son los nanoencapsulados conformando liposomas (frente a las nano-esferas y nano-cápsulas), debido a que los liposomas son estructuras muy flexibles, que protegen mejor al bioactivo y que permiten la encapsulación de una gran versatilidad de compuestos, lo que les aporta mayores ventajas para ser empleados en la industria alimentaria (Khorasani et al., 2018), además de su similitud con la membrana celular.

Los liposomas son vesículas esféricas a modo de estructura coloidal que pueden variar en tamaño (20 nm – 1 μ m) y en estructura (unilamelares, bilamelares o multilamelares en función del número de bicapas, figura 6), acorde a Bryla et al. (2015). De este modo existen: vesículas unilamelares pequeñas (1 bicapa, 20-100 nm), unilamelares medianas y grandes (1 bicapa, >100 nm), unilamelares gigantes (1 bicapa, >1 μ m), oligolamelares (5 bicapas, 100-1000 nm), multilamelares (5-25 bicapas, >500 nm) o multi-vesiculares (estructura de varios compartimentos, >1 μ m) (Sen et al., 2014). Estas diferencias dependerán principalmente del material encapsulante, de la sustancia bioactiva encapsulada y del método de elaboración de liposomas.

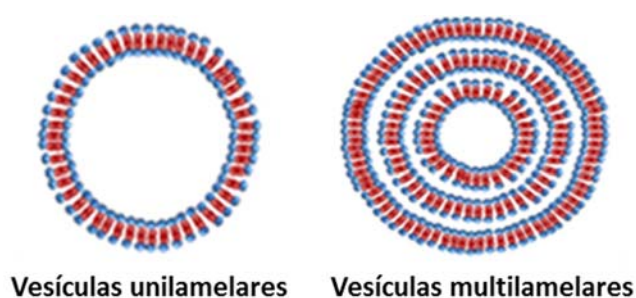


Figura 6. Esquema de liposomas unilamelares y multilamelares.

Los liposomas fueron descubiertos y primeramente fabricados por Bangham et al. (1965), por el método de hidratación de una película de lípidos. Existen otras tecnologías, según Zoghi et al. (2016), para la fabricación de liposomas, como son el método de extrusión, reemplazamiento de solventes orgánicos por medio acuoso, inyección de éter (vaporización del solvente), inyección de etanol, congelación-descongelación, evaporación en fase reversa, eliminación de detergentes, calentamiento, deshidratación-rehidratación, gradiente de pH, emulsión o sonicación. Uno de los métodos más comunes y utilizados para la elaboración de liposomas es la sonicación (Papahadjopoulos & Miller, 1967; Meure et al., 2008). Esta técnica es ampliamente utilizada para la obtención de nanopartículas pequeñas unilamelares con tamaños <100 nm a partir de vesículas multilamelares grandes (Zoghi et al., 2016), permitiendo reducir el tamaño de las vesículas (reduciendo el tamaño medio y la heterogeneidad de tamaños) sin alterar otras propiedades como la carga electrostática de la membrana o la eficacia de encapsulación (Chun et al., 2017).

Existen dos variantes basadas en el modo de inducción de ultrasonidos: un baño de ultrasonidos o una probeta de sonicación, siendo ambas opciones escalables a nivel industrial. En este último método, la probeta es introducida directamente en la dispersión liposomal, la cual se calienta mucho como consecuencia de la elevada energía administrada, haciendo necesaria su colocación en un baño de agua fría o hielo (Zoghi et al., 2016). Por tanto, si se elige esta opción como método de elaboración de liposomas se tendrá que controlar la temperatura de la dispersión, para evitar un sobrecalentamiento que pueda degradar los lípidos presentes en la preparación.

El proceso de fabricación de liposomas es muy repetitivo a idénticas condiciones, sin embargo, cualquier mínima variación en alguna de las condiciones puede dar lugar a liposomas con propiedades totalmente diferentes, variando no solo en el tamaño, sino también su estabilidad,

su eficacia de encapsular bioactivos, sus propiedades físicas, su capacidad de atravesar las membranas celulares, etc. Algunos factores bastante determinantes en el proceso de elaboración que pueden modificar las características de los liposomas son la composición de las vesículas (tipo de lípido, naturaleza del bioactivo, proporciones entre ambos, presencia de otros componentes como colesterol o crioprotectores, etc.), el método de elaboración (hidratación de película, sonicación, etc.) o las condiciones de conservación (como dispersión fresca, liofilizada, en refrigeración, en congelación, etc.). Otros que, por insignificantes que parezcan, también determinan las características de los liposomas pueden ser la temperatura máxima a la que se exponen las vesículas, el volumen de dispersión liposomal preparado o la colocación exacta de la probeta de sonicación (Zoghi et al., 2016).

Los liposomas están constituidos por un núcleo acuoso de carácter hidrofílico rodeado por una bicapa lipídica de carácter hidrofóbico, compuesta por dos capas de fosfolípidos formadas individualmente de dos cadenas hidrocarbonadas de ácidos grasos (hidrofóbicas) situadas en el centro de la bicapa unidas a una cabeza polar (hidrófila) localizada en ambos extremos de la bicapa, es decir, en contacto con el núcleo acuoso y con el exterior (superficie de membrana) (Figura 7). Esta estructura y ordenamiento les aportan a los liposomas una serie de características peculiares, razón por las que han sido elegidos como nuestro sistema modelo de encapsulación.

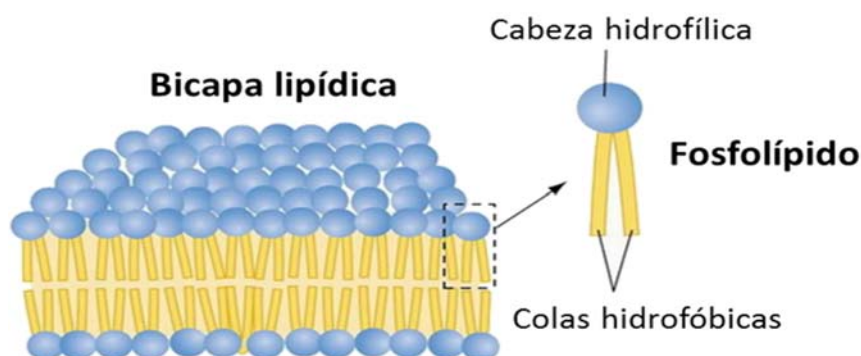


Figura 7. Estructura y conformación de un fosfolípido y de una bicapa lipídica.

Son vesículas que permiten la encapsulación en su interior de cualquier sustancia ya sea una proteína, una droga, un principio activo, un gen o estructuras más complejas como extractos bioactivos. Además, son consideradas estructuras anfipáticas (Figura 8), es decir, que permiten la incorporación tanto de compuestos hidrofóbicos (en la bicapa lipídica) como de compuestos hidrofílicos (en el núcleo acuoso y/o en la superficie de membrana) (Fathi et al., 2012).

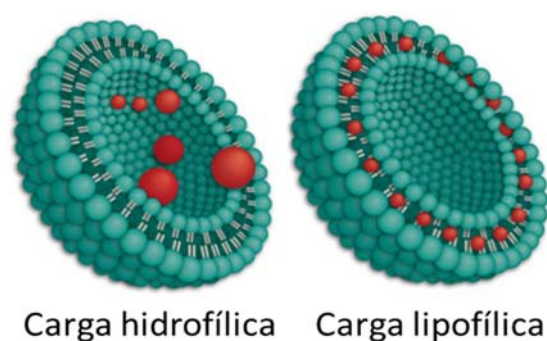


Figura 8. Estructura básica de un liposoma con dos tipos de relleno.

Esta particularidad les da la ventaja para funcionar como transportadores de cualquier tipo de sustancia independientemente de su naturaleza o composición. De este modo, son capaces de mejorar la solubilidad de sustancias insolubles en agua, es decir, compuestos predominantemente lipofílicos como podría ser el β -caroteno (Lin et al., 2018).

Las propiedades de una suspensión liposomal dependen no solo del tipo de compuesto encapsulado y del encapsulante, sino también de la eficacia de encapsulación de dicho compuesto. Este parámetro determina la cantidad de bioactivo atrapada por los liposomas, ya sea dentro del núcleo acuoso, dentro de la bicapa lipídica, o asociados a las cabezas polares de los fosfolípidos, tanto las que miran hacia el interior de la estructura como las que están orientadas hacia el exterior, quedando éstas últimas adheridas a la membrana externa de las vesículas. Esta localización dependerá de la composición y naturaleza del extracto bioactivo (hidrofílica o lipofílica). De este modo, una baja eficacia de encapsulación podría reducir los posibles beneficios que pueda proporcionar un determinado bioactivo. La eficacia de encapsulación depende de multitud de factores, como pueden ser la naturaleza del bioactivo, el material encapsulante, la concentración de bioactivo incorporada en las vesículas, el método de elaboración de liposomas, etc. Otros factores que pueden ser determinantes son el grado de lamellaridad de las vesículas, donde liposomas con mayor número de bicapas (mayor lamellaridad) presentan una eficacia de encapsulación mayor, siendo las vesículas multilamelares las de mayor tasa de encapsulación (Gerelli et al., 2008). Por otro lado, He et al. (2018) observaron en liposomas de fosfatidilcolina de soja conteniendo ibuprofeno que un mayor tiempo y potencia de sonicación dan lugar a liposomas con mayor eficacia de encapsulación, siendo ésta mayor para un tiempo de 20 min y potencia de 120W.

Otra característica es su similitud con las membranas biológicas debido a su estructura y composición basada en una bicapa de fosfolípidos, compartiendo así fisiología con las membranas celulares (Bavarsad et al., 2018). Esta característica les confiere una gran permeabilidad en la piel humana (Gupta et al., 2013), lo que les permite poder fusionarse con ella y liberar el bioactivo encapsulado en el interior del organismo (Bavarsad et al., 2018).

Dado el pequeño tamaño de los liposomas (del orden nanométrico), éstos podrían no ser digeribles y pasar rápidamente al intestino tras su ingestión y, gracias a su similitud con las membranas celulares, atravesar las microvellosidades de enterocitos y colonocitos, ya sea mediante fusión, invaginación o fagocitosis, pasando rápidamente al torrente sanguíneo y liberando al bioactivo en el sitio diana correspondiente. Esto les permitiría funcionar como vehículos naturales para el transporte (y protección) de cualquier extracto encapsulado al interior del organismo (Mozafari et al., 2008) de una manera rápida (en cuestión de minutos, pues teóricamente los liposomas no se digieren y pasan directamente al enterocito y de aquí a la sangre) y eficaz (es capaz de atravesar la membrana del enterocito de forma eficiente sin roturas ni pérdidas de bioactivo y llegar al torrente sanguíneo intacto).

El hecho de poder portar prácticamente cualquier bioactivo en su interior brinda la ventaja de encapsular extractos bioactivos procedentes de diversas fuentes naturales, con propiedades potencialmente beneficiosas y saludables para la salud. Además, el trabajar con materias primas naturales (en algunos casos procedentes de bioresiduos) así como la posibilidad de producir liposomas a gran escala (Jeon et al., 2015) nos permite reducir los gastos de producción para que el futuro producto sea de bajo coste. Por todas estas razones, un producto basado en liposomas tiene las características adecuadas para ser un alimento saludable acorde a las necesidades de los consumidores actuales. No solo el compuesto bioactivo encapsulado aporta beneficios, sino que el material encapsulante también puede tener repercusión positiva sobre la salud. De este modo, el uso de fosfolípidos de soja o de alguno de sus derivados (otra materia prima del sector agroindustrial infrautilizada) como material encapsulante aporta diferentes propiedades beneficiosas para el organismo.

La soja (Figura 9) es un cultivo de leguminosas originaria del sudeste asiático que data de hace 3000 años en China (Krishnamurthy & Shivashankar 1975). Actualmente es uno de los cinco principales productos vegetales a nivel global según la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) y el primero en la producción de aceite. A la soja se le atribuyen numerosas actividades funcionales como antioxidante, antiinflamatoria, antiproliferativa, antiestrogénica o hipocolesterolémica; diversas funciones en el organismo como función inmune, cognitiva o insulínica; y beneficios frente a diferentes enfermedades como la obesidad, diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares u osteoporosis (Wu et al., 2017). Todas estas propiedades son consecuencia de la presencia en su composición de compuestos fenólicos como isoflavonas (genisteína, daidzeína y gliciteína) y fitoalexinas (glicelinas) así como otros compuestos minoritarios pero igualmente importantes como carotenoides y tocoferol (Liu, 1997).



Figura 9. Planta, semillas y brotes de soja (*Glycine max*).

Uno de los derivados más ampliamente empleados dentro de esta especie es la lecitina de soja (Figura 10), que se obtiene como subproducto de la producción del aceite de soja y está constituida mayormente de lípidos saponificables (formados por un alcohol unido a uno o varios ácidos grasos de igual o diferente cadena a través de un enlace éster) o hidrolizables (típicos de grasas y ceras). A la lecitina de soja se le atribuyen beneficios para la prevención de enfermedades cardiovasculares, discapacidad cognitiva, hiperlipidemia, procesos inflamatorios o fatiga (Hirose et al., 2018).



Figura 10. Lecitina de soja.

Estas propiedades se deben a que la lecitina de soja es una mezcla rica en fosfolípidos que aportan beneficios contra una gran cantidad de enfermedades (Küllenberg et al., 2012). Los fosfolípidos están formados por dos colas hidrofóbicas de ácidos grasos (simétricas o asimétricas) unidas a una cabeza polar hidrófila compuesta por una molécula de glicerol y un grupo fosfato (Figura 11).

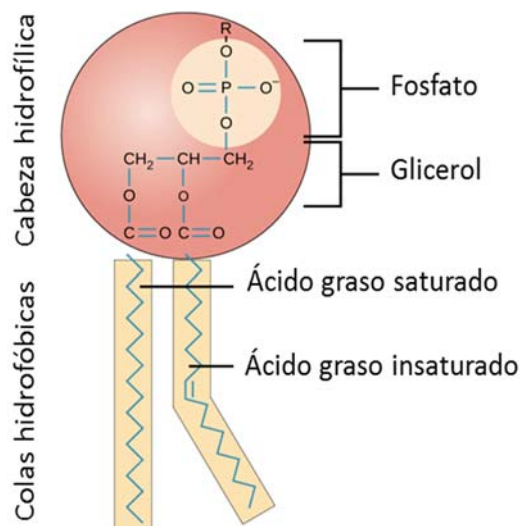


Figura 11. Estructura conformacional de un fosfolípido, pudiendo componerse de ácidos grasos saturados y/o insaturados indistintamente.

En el caso de la soja, poseen una elevada proporción de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales tienen importantes funciones regulando el metabolismo lipídico (Ramdath et al., 2017) y frente a diversos tipos de cánceres (Liu et al. 2017). Entre los ácidos grasos poliinsaturados mayoritarios en la lecitina de soja destacan el ácido linolénico y el ácido linoleico (Tripathi & Misra, 2005), siendo éste último el más común y el más importante, reduciendo enormemente el riesgo de padecer arteriosclerosis (Yang et al., 2018).

Más concretamente, uno de los fosfolípidos más abundantes en la lecitina de soja es la fosfatidilcolina, constituyente mayoritario de todas las membranas celulares y responsable de infinidad de propiedades beneficiosas que determinan el correcto funcionamiento del cuerpo humano, entre las que destacan el favorecimiento del crecimiento celular y la regeneración de la membrana, además de actuar a nivel de hígado, riñones, cerebro, pulmones o tracto gastrointestinal (Jäger et al., 2007). La fosfatidilcolina está conformada por dos cadenas de ácidos grasos (de diferentes tipos) unidas por una molécula de glicerol a una cabeza (grupo polar) de colina portando un grupo fosfato (Figura 12).

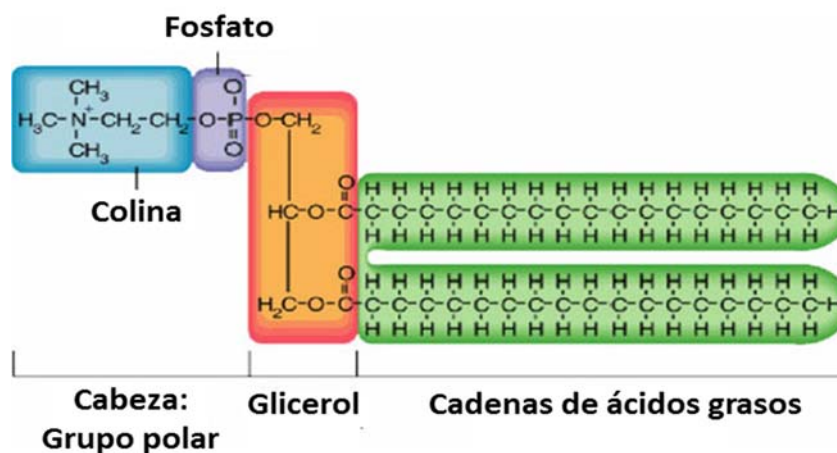


Figura 12. Estructura de la fosfatidilcolina.

A nivel farmacológico es frecuente la utilización de fosfatidilcolina sintética para la elaboración de liposomas, la cual usualmente tiene dos ácidos grasos saturados de cadenas idénticas y un precio elevado. El uso de lecitina o fosfatidilcolina de soja natural, frente a los fosfolípidos sintéticos, además de abaratar enormemente los costes, aporta un mayor grado de ácidos grasos insaturados en su composición, lo que implica mayores beneficios saludables, aún a riesgo de comprometer la estabilidad y permeabilidad de la vesícula. Por otro lado, el uso de lecitina de soja natural para la formación de liposomas no conlleva ningún impedimento a nivel de legislación alimentaria (Laye et al., 2008).

De esta manera, ambas partes (cápsula y extracto bioactivo) aportan propiedades potencialmente beneficiosas para la salud humana. Además, ambos componentes se complementan entre sí, ya que la cápsula de fosfatidilcolina protege al bioactivo de su degradación manteniendo su bioactividad intacta y mejora su eficacia y estabilidad (Mosquera et al., 2016) así como su solubilidad; mientras que el bioactivo puede proteger a la cápsula frente a la oxidación debido a sus propiedades (típica de este tipo de sistemas, según Wang & Wang, 2008) y le aportan un alto valor añadido como producto funcional.

3.3.1. Estabilización de liposomas

Los liposomas son utilizados normalmente como dispersiones o suspensiones frescas (en estado líquido), ya que se facilita su manejo y tienen una estabilidad relativa en el tiempo (Karn et al., 2014). Sin embargo, tiempos prolongados de conservación (> 1 mes) pueden inducir efectos negativos sobre las propiedades físicas de los liposomas, como son fusión, agregación o sedimentación de las vesículas en suspensión y la liberación parcial o completa del bioactivo encapsulado (Sharma & Sharma, 1997).

Existen diversas estrategias tecnológicas para mejorar la estabilidad de los liposomas, como son los tratamientos de congelación (Chen et al., 2010), liofilización (Sebaaly et al., 2016) o atomización (Gültekin-Özgüven et al., 2016). La alta presión hidrostática es un método de pasteurización en frío muy útil para preservar y descontaminar los alimentos (Rigaldie et al., 2003), el cual ya sido implementado en la industria, pero no se ha testado cuál es el efecto en los liposomas sometidos a alta presión isostática.

Sin embargo, una de las alternativas más eficientes es secar los liposomas mediante liofilización, proceso que elimina el agua contenida en la muestra congelada por sublimación. Debido a la ausencia de agua y a la baja temperatura utilizada, la mayoría de reacciones microbiológicas y de deterioro se lentifican o paran, dando lugar a un producto de excelente calidad (Ratti, 2001). De este modo, la liofilización incrementa la vida útil de las vesículas (evitando dichos efectos de fusión, sedimentación, etc.) y mejora su estabilidad en conservación, como observaron Stark et al. (2010) en liposomas recubiertos de polietilenglicol y conteniendo diversos crioprotectores; también mejora la biodisponibilidad del bioactivo encapsulado, como demostraron Catalan-Latorre et al. (2016) en liposomas elaborados a base de fosfatidilcolina de soja comercial y una mezcla de ácido hialurónico y polímeros sintéticos conteniendo curcumina como bioactivo. Además, la disponibilidad de los liposomas liofilizados podría facilitar su aplicación industrial como un ingrediente alimentario más convencional. La liofilización es el mejor método de eliminación de agua con obtención de productos finales de alta calidad en comparación con otros métodos de secado de alimentos (Genin & René, 1995).

Por tanto, en función de la finalidad y del uso que se le quiera dar a los liposomas (lo que condiciona su estado físico y tiempo de conservación), éstos se pueden presentar tanto como dispersión liposomal (líquida) como en estado liofilizado (seco), teniendo ambas formulaciones interesantes posibilidades de aplicación.

Una consideración a tener en cuenta es que el proceso de liofilización, a pesar de incrementar la estabilidad de las vesículas y del bioactivo, puede provocar efectos adversos, como son daños en la bicapa lipídica ocasionados por la formación de cristales de hielo durante el proceso de congelación (paso previo y necesario para liofilizar las muestras) o problemas de agregación de vesículas durante el proceso de deshidratación, propia de la liofilización (Chen et al., 2010). Por ello, se recomienda la adición de compuestos protectores (generalmente carbohidratos o polialcoholes) en la formulación liposomal, si ésta va a ser sometida a un proceso de congelación y deshidratación.

Uno de los compuestos más empleados es el glicerol (Figura 13), crioprotector reconocido por ser capaz de proteger a los liposomas frente a los posibles daños de la congelación y la liofilización (Stark et al., 2010). El glicerol podría modificar ligeramente las propiedades físicas de los liposomas interactuando con los fosfolípidos de la bicapa lipídica, así como con el bioactivo. Además, el glicerol ha demostrado mejorar la penetración en la piel por parte de los liposomas que lo contienen (Wang et al., 2014), lo que podría extrapolarse a una rápida y eficaz interacción con las células del intestino (enterocitos).

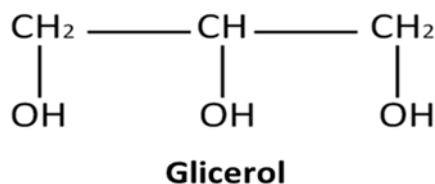


Figura 13. Fórmula molecular del glicerol.

Otro protector muy útil es la trealosa (Figura 14) (Hemanthkumar & Spandana, 2011). La trealosa es más conocida como lioprotector que como crioprotector. Tanto los procesos tecnológicos de estabilización como la adición de crio- o lioprotectores en la formulación liposomal pueden condicionar las características de partícula y propiedades físicas de estos liposomas, así como su comportamiento posterior si van a constituir ingredientes en nuevas formulaciones alimentarias.

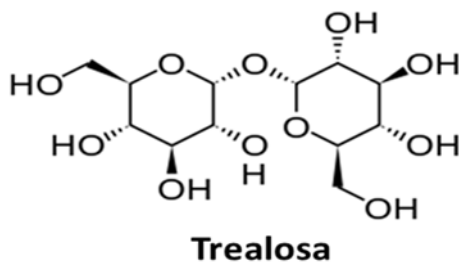


Figura 14. Fórmula molecular de la trealosa.

3.3.2. Aplicaciones y Regulación de la utilización de liposomas para alimentación

Los liposomas son estudiados y utilizados desde hace décadas, en concreto desde el año 1965 cuando fueron descubiertos y empleados por primera vez. Desde entonces han sido una novedosa y creciente aplicación muy útil en los ámbitos de la cosmética, incorporando compuestos con beneficios potenciales para la piel tales como el ácido glicirretínico (Jia et al., 2017), o de la medicina, empleando diferentes drogas encapsuladas en liposomas para paliar los efectos de diversas enfermedades, algunas de ellas incluso consideradas epidemias como la malaria (Tang et al., 2017) o el virus del VIH (Nayak et al., 2017). Existen actualmente numerosas

empresas que comercializan productos basados en liposomas conteniendo extractos complejos o compuestos bioactivos aislados destinados al ámbito de la cosmética. Un ejemplo es la casa comercial “MALTI DERM” que distribuye liposomas incorporando vitaminas antioxidantes en formato ampollas para el tratamiento de las arrugas y el envejecimiento mediante aplicación tópica, basando su efectividad en la penetración del liposoma en la piel a capas más profundas donde libera el bioactivo, y evitando irritaciones superficiales. También es posible encontrar a la venta productos de liposomas enfocados al campo farmacéutico y médico, como es el caso de la casa comercial “Shire” que comercializa el producto ONIVYDE, un fármaco basado en liposomas con el bioactivo irinotecán aplicable por inyección intravenosa para el tratamiento del cáncer de páncreas (Figura 15), basando en este caso la mejora del suministro del bioactivo por medio de liposomas a una mayor persistencia en circulación sistémica de irinotecán liposomal pegilado, con un tiempo medio de permanencia de 50 horas frente a 8 horas con irinotecán (Chang et al., 2015).



Figura 15. Productos comercializados de liposomas en ámbitos de cosmética (izquierda) y medicina (derecha).

Sin embargo, los liposomas han sido menos estudiados en el ámbito de la alimentación y la nutrición, y a día de hoy son muy escasos los productos comercializados incorporando liposomas, a pesar de las enormes aplicaciones potenciales que presentan, como pueden ser la mejora de la evaluación sensorial. Esta escasa comercialización ha sido en gran parte debida a la restrictiva política de inclusión de alimentos por parte de la Unión Europea. Hay que considerar que las partículas de nano-escala pueden tener un presumible inconveniente, en relación precisamente a su tamaño, sobre el impacto que puedan ejercer en el organismo humano, animales o en el medio ambiente, debido a sus potenciales efectos tóxicos, que en ocasiones es desconocido, pero hay que tener en cuenta la naturaleza y forma del material. Este tipo de materiales podrían penetrar y acumularse en tejidos profundos, formando o modificando enlaces a nivel celular y subcelular, pudiendo ocasionar efectos no deseados. También se desconocen sus efectos tras su aplicación en largos periodos de tiempo (Simões et al., 2017). Por ello, la nanotecnología es un sector meticulosamente evaluado y regulado por diversos organismos para asegurar la bioseguridad alimentaria y humana. Aun así, hay que mencionar que los liposomas son un tipo de vesícula de nano-escala peculiares, dado que son estructuras flexibles capaces de invaginarse y de formar parte de las membranas.

Sin embargo, desde hace escasamente tres años esta política ha cambiado, pues según el Reglamento Europeo de Regulación de Alimentos (R (UE) nº 2015/2283 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de Noviembre de 2015), los alimentos consistentes en micelas o liposomas podrán ser incluidos en la definición oficial de nuevos alimentos, catalogada por la Unión Europea.

En su última legislación establece como definición de nuevo alimento *“todo alimento que no haya sido utilizado en una medida importante para el consumo humano en la Unión antes del 15*

de mayo de 1997, con independencia de las fechas de adhesión de los Estados miembros a la Unión, y que esté comprendido por lo menos en una de las categorías siguientes: viii) alimento que consista en nanomateriales artificiales, tal como se definen en la letra f) del presente apartado: cualquier material producido intencionadamente que tenga una o más dimensiones del orden de los 100 nm o menos o que esté compuesto de partes funcionales diferenciadas, internamente o en superficie, muchas de las cuales tengan una o más dimensiones del orden de 100 nm o menos, incluidas estructuras, aglomerados o agregados, que pueden tener un tamaño superior a los 100 nm, pero conservan propiedades que son características de la nano-escala”.

“Entre estas propiedades características de la nanoescala figuran: i) las relacionadas con la gran superficie específica de los materiales considerados y/o ii) las propiedades físico-químicas específicas que son distintas de la forma no nanotecnológica del mismo material”. Dado el reglamento vigente, los liposomas que se elaboran en este trabajo podrían llegar a ser considerados e incluidos por la Unión Europea como nuevos alimentos.

Esta nueva Política en la Regulación de Alimentos ha permitido la aparición de empresas dedicadas a la comercialización de productos basados en liposomas con fines alimentarios o dietéticos. Ejemplos son los suplementos dietarios de liposomas “Personal Trainer In” elaborados por la División Nutraceuticals Products de Idraet Group (Buenos Aires, Argentina) o los suplementos nutricionales de liposomas “Altrient” conteniendo bioactivos varios (vitamina C, vitamina B, glutatión, ácido R- α -lipoico o acetil R-carnitina) de la casa comercial Abundance & Health elaborados por LivOn Labs (Nevada, Estados Unidos), ambos para ser administrados vía oral (Figura 16).



Figura 16. Productos comercializados de liposomas en el sector alimentario y dietético.

Además, en la bibliografía actual existen artículos de liposomas encapsulando algunas materias primas naturales infrautilizadas o descartadas con fines alimentarios, como son liposomas de hidrolizado de colágeno (Mosquera et al., 2016) y liposomas de extractos de piel de granada (Altunkaya, 2014) o algunos de sus componentes principales, como liposomas de ácido clorogénico (Feng et al., 2016), y liposomas de astaxantina (Chiu et al., 2016), tocoferol (Neunert et al., 2015) o ácidos grasos poliinsaturados (Semenova et al., 2016), componentes de la grasa de los residuos de langostino.

3.3.3. Absorción de nutrientes

Cuando los liposomas entran en contacto con la superficie celular (Figura 17), el transporte de bioactivos tiene lugar por la fusión de las vesículas liposomales con la membrana (transferencia

mediada por proteínas) o por fagocitosis y pinocitosis (Park et al., 2014), procesos facilitados por el tamaño nanométrico de las vesículas y su similitud con las membranas celulares humanas. La fagocitosis es el proceso por el cual una célula rodea con su membrana citoplasmática a una sustancia sólida, la captura y la introduce en su interior. La pinocitosis es un tipo de endocitosis, al igual que la fagocitosis, pero en este caso la vesícula formada contiene líquido con sustancias en suspensión. El principal sitio de absorción es el intestino delgado, pero también puede ser en la boca, estómago y colon en función de la naturaleza del compuesto y el sistema de transporte empleado, y puede ser absorbido en su forma original o metabolizada (McClements, 2015), en general en las mucosas o a nivel transdérmico. Esta propiedad permite encapsular bioactivos en liposomas y facilitar su llegada al sitio diana en el interior del organismo, evitando su deterioro o degradación y permitiendo aprovechar sus propiedades funcionalmente beneficiosas para la salud. Existen multitud de factores que determinan una mejor o peor permeabilidad y por tanto absorción de liposomas por el organismo, como pueden ser la composición del bioactivo y su eficacia de encapsulación o la presencia de otros componentes en la formulación liposomal, tales como crioprotectores. Se ha demostrado que el glicerol empleado como crioprotector de vesículas mejora la permeabilidad y penetración en la piel de las mismas (Wang et al., 2014).

La administración de fármacos/compuestos por vía oral se compone de dos rutas: la mucosa bucal y la mucosa sublingual (Sandri et al., 2015). Ambas mucosas orales permiten que los bioactivos y liposomas, tras mezclarse con la saliva, lleguen directamente a la circulación sistémica a través de capilares y venas, favorecido por la elevada vascularización de dichas mucosas (Patel et al., 2011) y las características propias de los liposomas. Para la administración oral el rango de tamaño liposomal adecuado es de 100-200 nm y con el menor número de bicapas posibles (Mozafari et al., 2008).

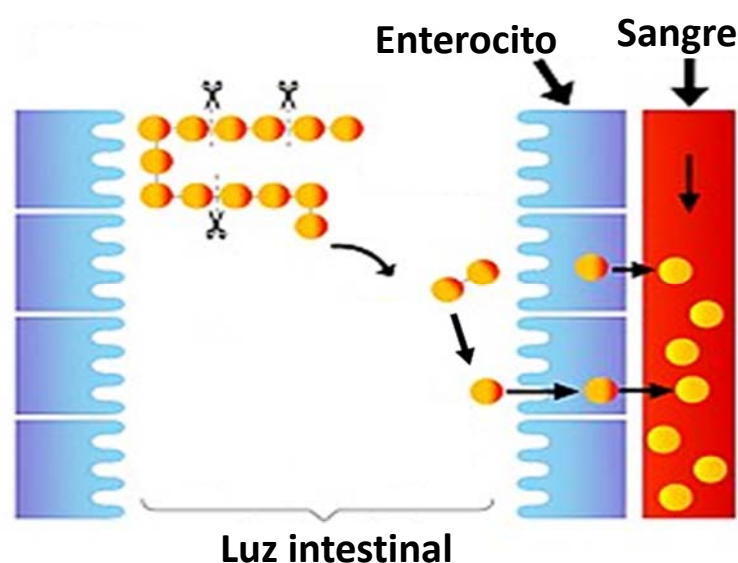


Figura 17. Esquema de mecanismo de absorción de compuestos.

Actualmente existen algunos productos comercializados basados en los beneficios de la absorción directa de compuestos bioactivos y liposomas que se administran por vía oral. Un ejemplo de ellos son los "WUG®-Functional Gums" (Figura 18), es decir, chicles que contienen diversos compuestos bioactivos en su interior como complemento para la realización de actividad física moderada o extrema, la mejora de las relaciones sexuales, evitar los síntomas de la resaca, activador del bronceado, con efecto relajante, etc. La ventaja de estos chicles radica en que al masticarlos, los bioactivos son absorbidos a través de las mucosas bucal y sublingual, pasando al torrente sanguíneo y posteriormente al sitio diana de manera rápida y eficaz

(5 minutos), frente a los aproximadamente 40 minutos que requieren aquellos productos que son sometidos a digestión gastrointestinal, como es el caso de productos sólidos, bebidas energéticas, el café, suplementos vitamínicos o comprimidos. Otro producto con semejante finalidad es “Oral Lyn” de Endorex Corporation Orasome™, un spray bucal a modo de inhalador con liposomas incorporando insulina destinado a los pacientes de diabetes. La ventaja de este producto se basa en la facilidad de su aplicación (frente a las inyecciones) y la rapidez de actuación. Según los Informes de evaluación de tecnologías sanitarias (AETSA, 2010) para este producto, “Los resultados para el uso pandrial de la insulina de administración oral/bucal fueron favorables, con resultados equivalentes o superiores a la insulina inyectada, obteniendo una disminución más rápida de la glucemia postpandrial frente al tratamiento estándar y un pico más rápido y corto de insulinemia”. Hoy en día existen otros productos para tratamiento de la diabetes tipo II a nivel oral que están en fase de desarrollo.



Figura 18. Productos comercializados para ser administrados vía oral.

En cuanto a la absorción intestinal puede tener lugar a través de las células del intestino delgado (enterocitos), teniendo que ser sometido el compuesto ingerido a una digestión gastrointestinal previa. Las células Caco-2 son células modelo del epitelio humano derivadas de carcinoma de colon. Se trata de una población heterogénea que rápidamente se puede diferenciar en una monocapa de células con morfología y madurez de enterocitos (Simões et al., 2017). Es por ello que son ampliamente utilizadas para estudios experimentales de absorción de compuestos, entre otros. Autores como Fernández-Ávila et al. (2016) estudiaron el efecto de emulsiones aceite-agua encapsulando ácido linoleico en un cultivo de células Caco-2, observando que las emulsiones protegían al bioactivo durante su liberación, digestión y transporte a través de la monocapa de células Caco-2. Otros autores obtuvieron resultados similares, sin embargo, es completamente necesario el estudio *in vivo* bajo condiciones de digestión reales para verificar los resultados obtenidos *in vitro*.

3.4. Incorporación de liposomas en matrices alimentarias

Otra ventaja o posibilidad que ofrecen los liposomas es la de su incorporación en diferentes matrices alimentarias (McClements & Xiao, 2017), tanto de origen animal (cárnico o pesquero, figura 19) como vegetal, con el objetivo de que ambas partes se aporten beneficios recíprocamente permitiendo obtener un producto funcional con mejores propiedades y más saludables que cualquiera de los componentes que lo conforman individualmente. En este

sistema, la matriz protege a los liposomas y al bioactivo encapsulado dentro de éstos, evitando su desestabilización o degradación por el proceso de digestión (enzimas, pH,...) mientras que el bioactivo (protegido a su vez por la cápsula) proporciona la potencial actividad biológica principal, adicional a la de la cápsula y la matriz, permitiendo obtener productos de alto valor añadido. La incorporación de liposomas encapsulando compuestos bioactivos en alimentos funcionales permite un enriquecimiento con componentes saludables y la prevención de enfermedades (Singh, 2016). El diseño de gamas de productos diversos que puedan formar parte de la dieta diaria es lo que de verdad hará que los alimentos funcionales estén verdaderamente integrados en la alimentación de los consumidores. La elección de añadir liposomas en las matrices alimentarias y no los fosfolípidos tal cual se ha basado en que estos últimos son susceptibles de oxidación lipídica mientras que en forma de liposomas podrían reducir su grado de enranciamiento y según el bioactivo adicionado a su vez el del alimento. Además, la conformación de liposomas, tal y como se ha explicado antes, presenta una serie de particularidades que facilitan o mejoran las características finales del producto.



Figura 19. Reestructurados de origen pesquero (izquierda) y cárnico (derecha).

Existen algunos artículos donde los autores han elaborado diversas matrices alimentarias incorporando compuestos encapsulados en liposomas o estructuras similares. Un ejemplo es la elaboración de quesos incorporando liposomas con enzimas (Kheadr et al., 2000) o péptidos antimicrobianos (Malheiros et al., 2012). Esta nanotecnología también se ha empleado en margarinas y mayonesas con el objetivo de prevenir la oxidación de grasas insaturadas (Gibbs et al., 1999) o en alimentos a modo de lasañas proteicas, como liposomas encapsulando un péptido activo rodeado de poli-Lisina (antimicrobiano) incorporados en matrices de películas gruesas (tipo obleas de pasta) formuladas con músculo de langostino cocido (Alemán et al., 2016).

3.4.1. Incorporación en músculos de pescado

Son numerosas las matrices alimentarias potencialmente compatibles con la incorporación de liposomas, siendo una de las más destacadas los modelos basados en músculo de pescado para la obtención de productos de alto valor añadido. El músculo de pescado es uno de los ejemplos más típicos de fuentes proteicas de origen animal con un alto valor nutricional. Tiene una fácil digestibilidad, mejora el metabolismo de lípidos, de antihipertensivos, estimula la fibrinólisis y actúa contra la obesidad (Hosomi et al., 2012). Al igual que en el caso de los extractos bioactivos y el material encapsulante para la formación de liposomas, las materias primas utilizadas como matriz alimentaria también podrían ser descartes y especies infrautilizadas procedentes de la industria pesquera o partes de ellas. Aproximadamente, el 81 % de la producción mundial de pescado va destinada al consumo humano, mientras que el 19 % restante (27 millones de toneladas) va destinado a otros propósitos (FAO, 2010a y FAO, 2010b). Es decir, una inmensa cantidad de pescado, principalmente debido a su bajo valor comercial por inadecuadas propiedades sensoriales, es diariamente descartado y desaprovechado. Además, estos descartes suponen un problema medioambiental y conducen a la sobreexplotación de determinadas especies debido a su consumo preferente (Guillén et al., 2018). Recientemente,

existe un interés considerable en el uso de especies procedentes de descartes de la pesca, cuyo valor comercial puede ser incrementado mediante novedosas tecnologías (Ordóñez-Del Pazo et al., 2014), evitando problemas medioambientales y favoreciendo el equilibrio de las especies en los ecosistemas marinos. Los descartes de pescado no están permitidos legislativamente para el consumo humano, sin embargo, una transformación adecuada en productos de pescado reestructurados basados en geles a partir de estos descartes podría ser una alternativa, pudiendo representar un uso integral y económicamente rentable de estas fuentes desechadas.

Los reestructurados provienen generalmente de pescados infrautilizados o de residuos del fileteado con bajo valor comercial que se someten a un determinado procesamiento para la obtención de un producto final nuevo con un valor añadido y mejor salida en el mercado. La materia prima ha de ser de buena calidad, tanto higiénica como funcional. Ésta se puede utilizar y presentar de diversas formas, ya sea mediante modificación física, como un *mince* (músculo picado), mediante modificación física y química, como un gel (tras un proceso de gelificación que implica solubilización y establecimiento de enlaces que se suele llevar a cabo mediante tratamiento térmico), etc., presentando en cualquier caso excelentes propiedades sensoriales. El hecho de reestructurar permite controlar todas las características físico-químicas del producto final, como son la coloración, textura, estructuración, composición, contenido en agua, etc., y sus propiedades funcionales mediante la adición de determinados componentes o ingredientes tecno-funcionales. Por tanto, los reestructurados de pescado suponen una alternativa tecnológica muy rentable e interesante que permiten la explotación de recursos marinos poco comercializados. Además, se pueden incluir nutrientes o compuestos bioactivos en los reestructurados con la finalidad de obtener un producto pesquero funcional desde el punto de vista nutracéutico con mayor valor añadido.

Los reestructurados de pescado necesitan de tratamiento o procesamiento para la obtención del producto con características organolépticas concretas, sobre todo de textura, adecuadas para su consumo. Uno de estos tratamientos es el proceso de gelificación, que conlleva una modificación físico-química del sistema alimentario en su conjunto y en especial de la proteína miofibrilar. La gelificación del músculo parte de un proceso de molienda y mezclado con cloruro sódico a bajas temperaturas para incrementar la solubilidad de las proteínas miofibrilares, quedando el músculo en un estado de "sol" (homogeneizado). En el paso siguiente se procede a la adición de los ingredientes tecnológicos y, en su caso, de los compuestos bioactivos requeridos. Cuando la masa resultante es sometida a calentamiento y alcanza los 40 °C se forma una estructura de red proteica muy poco compacta y reversible principalmente formada por interacciones hidrofóbicas y enlaces covalentes ϵ -(γ -glutamyl)-lisina que, con altas temperaturas (frecuentemente >80 °C), da lugar a una estructura organizada, compacta y termoestable reforzada por enlaces covalentes disulfuro irreversibles, el gel de pescado (Wei et al., 2018). Actualmente existen métodos alternativos a la gelificación térmica que no implican el calentamiento de la muestra, como son las altas presiones (Montero et al., 2001) o mediante métodos biotecnológicos como la aplicación de enzimas que faciliten el establecimiento de enlaces, como es la enzima transglutaminasa (Montero et al., 2005a).

Un ejemplo de posible aprovechamiento de pescados descartados es la obtención de surimi (Figura 20), con una producción de 1,5 millones de toneladas en China en 2015, según Yuan & Zhao (2016). Se trata de un concentrado proteico de pescado conteniendo proteínas miofibrilares obtenido mediante la eliminación de espinas, picado, lavado y refinado a partir de carnes de pescado, en el cual se eliminan proteínas sarcoplasmáticas, sangre, lípidos y enzimas, previo a la deshidratación y mezcla con crioprotectores (Wei et al., 2018). El lavado permite la eliminación de sustancias o componentes que puedan desestabilizar la proteína miofibrilar, mientras que el refinado permite la eliminación de cualquier partícula y espina residual, si bien disminuye el rendimiento un 15-20 %. Constituye un producto de pescado intermedio de gran interés debido a su bajo contenido en grasa, y su elevado contenido en proteínas musculares

(Ueki et al., 2014). Los geles resultantes permiten el diseño de una amplia variedad de productos de conveniencia aptos para un rápido y fácil cocinado y consumo. Además, el surimi permite su combinación con otros sistemas como liposomas para la obtención de productos funcionales.



Figura 20. Manto y surimi del calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

Existen en la bibliografía numerosos estudios sobre este tipo de productos, como el de Moreno et al. (2009) con surimi del calamar *Dosidicus gigas* o el de Suklim et al. (2003) directamente con el calamar *Illex illecebrosus* (especie infrautilizada) como productos reestructurados. La elaboración de geles de surimi a partir de *Dosidicus gigas* permite eliminar las enzimas proteolíticas y los compuestos nitrogenados (con valores realmente elevados en estas especies) que dan lugar a olores y sabores desagradables, a la vez que se obtiene un producto de procesado intermedio compuesto por un concentrado de proteína miofibrilar muy purificada, exento de compuestos indeseables y altamente estable a la congelación (Careche et al., 2004). El tiempo y condiciones de conservación del surimi pueden ser determinantes en sus propiedades físico-químicas y estructurales, como son la textura, la capacidad de retención de agua o incluso la capacidad de su proteína para formar geles (An et al., 2018).

Entre los músculos de pescado empleados para la elaboración de reestructurados también se podrían utilizar aquellos que excedan la cuota de captura máxima permitida por la Política Pesquera Común establecida por el Parlamento Europeo, incluso aquellas especies nobles, que son muy apreciadas para su consumo directo y por tanto tienen buena aceptación en el mercado por sí mismas. Un pescado altamente apreciado y muy consumido, tanto en fresco como en filetes congelados, es la merluza europea (*Merluccius*, figura 21).



Figura 21. Ejemplar y filetes de la merluza europea (*Merluccius merluccius*).

Esta especie posee una excelente capacidad de formar gel a partir de su proteína muscular (Moreno et al., 2010), hecho que junto con las magníficas propiedades organolépticas que posee aportadas por su color claro, sabor suave y poca grasa, podría ser aprovechado para obtener un producto funcional saludable con un alto valor añadido basado en un gel de merluza como matriz alimentaria. El uso del género *Merluccius* como modelo de pescado para obtener

productos reestructurados ya ha sido previamente ensayado por otros autores, como Zhou & Li-Chan (2009) y Cardoso et al. (2008), con *Merluccius productus* y *Merluccius capensis*, respectivamente.

La importancia de los liposomas en estos sistemas bioactivo-cápsula-matriz radica en que las actividades de los bioactivos pueden verse afectadas negativamente por la interacción excesiva del bioactivo con las proteínas de la matriz o por la degradación térmica durante el proceso de gelificación (Montero et al., 2005b). Sin embargo, la encapsulación en liposomas de los bioactivos mejora la eficacia y estabilidad de los mismos cuando son incorporados en sistemas alimentarios (Mozafari et al., 2008), ya que protegen al bioactivo de su interacción con otros componentes de la matriz alimentaria (da Silva Malheiros et al., 2010) y de otros efectos perjudiciales asociados a factores tales como el pH del alimento o el tratamiento térmico de procesado o pasteurización. Además, la incorporación de liposomas liofilizados en matrices permite ajustar el contenido de agua del gel resultante, lo que es muy interesante para poder modular las propiedades de textura del mismo.

3.4.2. Incorporación en películas comestibles

Otra matriz modelo de interés en la industria alimentaria con un enorme potencial de aplicación son las películas comestibles, tanto de origen vegetal como animal. El envasado de alimentos tiene como finalidad la conservación y protección de los mismos, dirigidos a paliar los efectos del crecimiento microbiano y la oxidación (Tharanathan, 2003). Los envases plásticos cumplen esta función y tienen muy buenas propiedades, sin embargo, no son biodegradables y representan un problema medioambiental (Kirwan & Strawbridge, 2003). Por ello, en los últimos años se ha incrementado el interés por la elaboración de envases comestibles y biodegradables, los cuales se pueden elaborar a partir de materiales de desecho de la industria alimentaria o bien a partir de polímeros naturales (Figura 22).

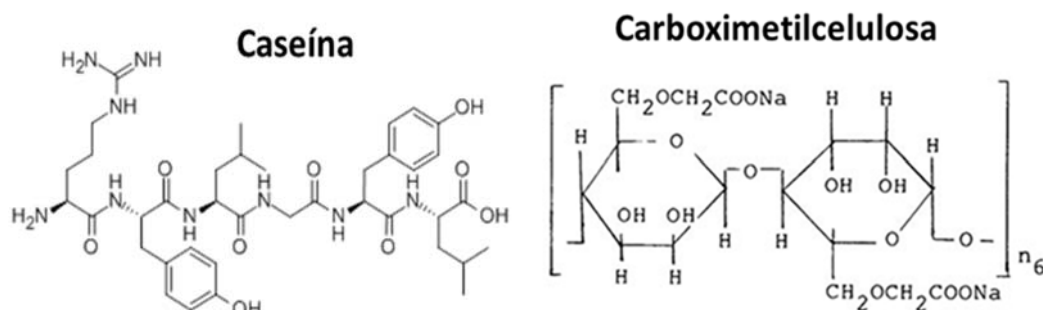


Figura 22. Fórmulas químicas de la caseína (caseinato sódico) y de la carboximetilcelulosa.

El uso de películas comestibles biodegradables es una herramienta muy útil para preservar las propiedades potenciales de los bioactivos, evitando problemas medioambientales y mejorando la sostenibilidad del procesamiento (Pérez-Mateos et al., 2009), a la vez que se obtiene un alimento de carácter funcional cuando son combinados con liposomas. Recientemente, existe un creciente interés en el empleo de películas y recubrimientos comestibles de alimentos elaborados a partir de biopolímeros naturales (Boelter & Brandelli, 2016), los cuales están totalmente disponibles en la naturaleza. De especial interés son las estrategias basadas en el desarrollo de matrices alimentarias tipo película conformadas por biopolímeros en combinación con la nanotecnología, con el objetivo de transportar agentes bioactivos al interior del organismo y controlar su liberación (Chirra & Desai, 2012).

Al igual que sucedía con los modelos de músculo de pescado, dada la susceptibilidad de los péptidos a ser degradados por su exposición a condiciones extremas o por posibles interacciones

con otros componentes de la matriz (Aasen et al., 2003), la presencia de liposomas puede ser altamente ventajosa. Las películas permiten la protección de liposomas y bioactivos (Cui et al., 2017b) a la vez que las vesículas son capaces de modificar las propiedades físicas de la matriz (Alemán et al., 2016). En la elaboración de cualquier película se hace necesaria la adición de un agente plastificante como es el glicerol (Manca et al., 2013). El glicerol, dada su elevada densidad, induce un efecto de fluidificación sobre la película que permite su distribución homogénea y su adecuada estructuración, mejorando sus propiedades mecánicas y evitando que ésta se rompa o agriete (Carvalho et al., 2018).

Las películas con liposomas pueden ser empleadas de dos formas muy diferentes. Por un lado, pueden ser ingeridas por sí solas como un alimento funcional propio o bien pueden funcionar como recubrimientos de otros alimentos de baja humedad (Sathivel, 2005), como podrían ser “barritas de cereales” (Figura 23), para sustituir a las películas sintéticas, o formando ellas mismas sus propias bolsas comestibles para incluir los alimentos a modo de gyosas, ravioli, etc. (Figura 24), conformando ambos componentes el alimento funcional. La aplicación de estos recubrimientos no tiene por qué tener límites, ya que cambiando las condiciones de elaboración y la concentración del glicerol podrían obtenerse películas de mayor grosor y menor efecto plastificante, pudiendo tener otro tipo de aplicaciones envolventes, como podrían ser a modo de rollitos de primavera o fajitas (Figura 25).



Figura 23. Películas comestibles útiles para recubrir otros alimentos de baja humedad.



Figura 24. Películas comestibles útiles como bolsas comestibles englobando alimentos.



Figura 25. Películas comestibles útiles como material envolvente.

La elección de una u otra “plataforma de película” para suministrar el bioactivo funcional encapsulado dependerá de varias estrategias, principalmente respecto a las características físico-químicas del bioactivo y la dosificación (Borges et al., 2015). De este modo, mientras que las películas tipo recubrimiento pasarán necesariamente por el tracto gastrointestinal (sometiéndose a digestión), dado que se ingieren en acompañamiento de otro alimento, las películas ingeridas de manera separada tienen mayor posibilidad de liberar el bioactivo directamente en la cavidad bucal.

La mucoadhesión representa la unión de macromoléculas a la superficie de un epitelio (Sandri et al., 2015). De este modo, las películas podrían ser utilizadas como sistemas mucoadhesivos que permitan la liberación rápida y unidireccional del bioactivo en la cavidad oral mejorando así la biodisponibilidad de los bioactivos en boca (McClements, 2013) y previniendo su paso al tracto gastrointestinal (Silva et al., 2015). Esto es posible gracias a que las mucosas bucal y sublingual son altamente permeables y permiten que nanocápsulas y bioactivos pasen directamente al sistema circulatorio (Patel et al., 2011). Diferentes autores describen que el mecanismo de mucoadhesión requiere 3 etapas sucesivas: contacto (adherencia), interpenetración y consolidación. Para la primera etapa de adhesión, el estado físico está fundamentalmente influenciado por la hidratación, en el segundo se establece el contacto entre el polímero altamente adhesivo y el epitelio de la mucosa, produciendo una interacción a nivel de la capa de moco (con alto contenido en mucina) y en el tercero, después de un tiempo, se establecen vínculos mecánicos y químicos (Ivarsson & Wahlgren, 2012; Sandri et al., 2015). Este tipo de películas representarían otro producto funcional alternativo destinado a que los liposomas que contienen sean adsorbidos a nivel bucal y sublingual, con las ventajas que ello representa.

Los bioactivos vehiculizados en las películas a modo de recubrimiento no tienen esta facilidad de difusión, pues son rápidamente mezclados con el bolo alimenticio y tienden a pasar al tracto gastrointestinal. Estas películas protectoras permiten alargar la vida útil de los alimentos que recubren y están diseñadas para consumirlas junto al producto (Rojas-Graü et al., 2007). Además de preservar la estructura de los liposomas y la actividad del bioactivo encapsulado (Campos et al., 2018), dichas películas actúan como barrera frente a diversos factores como son la humedad, el oxígeno, dióxido de carbono, aditivos o incluso componentes intrínsecos del propio alimento (Wu et al., 2015).

Hay publicados varios trabajos acerca de películas con liposomas, como las de carboximetilcelulosa incorporando liposomas rellenos con polifenoles de Silva-Weiss et al. (2018), las elaboradas por Alemán et al. (2016) a partir de músculo de langostino cocido con liposomas rellenos de péptidos antioxidantes y antihipertensivos pensada para funcionar como un “rollito”, o por Imran et al. (2012) a base de hidroxipropilmetilcelulosa con nanocápsulas de nisina, destinadas a funcionar como embalaje de alimentos.

3.5. Digestión gastrointestinal *in vitro*

La determinación de la bioactividad y del contenido de un compuesto o nutriente no es suficiente para determinar sus efectos potenciales *in vivo* asociados con el metabolismo que tiene lugar tras el proceso de absorción. Por ello, es necesario evaluar la biodisponibilidad y efectividad biológica de los compuestos bioactivos (Karaś et al., 2017). La bioeficacia de un compuesto activo depende de la matriz encapsulante, las enzimas y estructuras moleculares implicadas en la digestión, la digestibilidad, la solubilidad del bioactivo, su bioaccesibilidad, etc. Además, parece ser que solo a través del conocimiento del tejido/órgano específico donde acaban llevando a cabo su acción los compuestos encapsulados en liposomas es posible mejorar su desarrollo y eficacia y garantizar la seguridad alimentaria, comprobando la ausencia de toxicidad de dichos bioactivos (Pinheiro et al., 2017).

El término biodisponibilidad de un compuesto es la proporción ingerida de un nutriente o componente que puede ser absorbida y queda disponible en el sistema circulatorio para su utilización. Abarca la digestión gastrointestinal (liberación), absorción, distribución en los tejidos, metabolismo y excreción, y es determinada *in vivo* en animales o humanos (Carbonell-Capela et al., 2014). Sin embargo, como etapa previa, se suele determinar la bioaccesibilidad, que generalmente se evalúa mediante digestión gastrointestinal *in vitro* incluyendo varias fases: la liberación del compuesto de la matriz, las modificaciones durante el proceso de digestión y la absorción por las células del epitelio intestinal. La bioactividad se define como el efecto específico obtenido después de la exposición de una sustancia y puede ser *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. Esta incluye la captación del bioactivo por el tejido y la respuesta fisiológica, ya sea antioxidante, anticancerígena, antiinflamatoria, antialérgica o antibacteriana (Carbonell-Capela et al., 2014).

El proceso de digestión gastrointestinal comprende varias etapas: una fase inicial en boca donde se produce la hidrólisis de carbohidratos por la enzima amilasa, una fase estomacal donde tiene lugar la hidrólisis ácida de lípidos (por la lipasa gástrica) y de proteínas (por la pepsina), y finalmente una fase intestinal que se divide a su vez en la fase en el intestino delgado con la hidrólisis de proteínas (proteasas intestinales), almidón (amilasa) y lípidos (lipasa pancreática) y la interacción con las microvellosidades intestinales (absorción), y en la fase en el intestino grueso, con la interacción con la microflora (Figura 26). Destacan dos mecanismos de transporte de bioactivos a través del epitelio intestinal: entre células vía uniones estrechas (ruta paracelular) o a través de las células intestinales (ruta transcelular). A lo largo de todo el proceso de digestión se dan algunos pasos clave, como son los cambios de pH del medio, variaciones en el tipo y concentración de iones o la presencia de enzimas, factores que determinan las interacciones, estado físico, composición y estructura de los liposomas (Pinheiro et al., 2017). Durante la digestión gastrointestinal *in vitro* (simulada) se dan una serie de condiciones o procesos que pueden alterar las propiedades y características físico-químicas de los liposomas, como son variaciones de pH, oxígeno, diluciones de la muestra, etc.

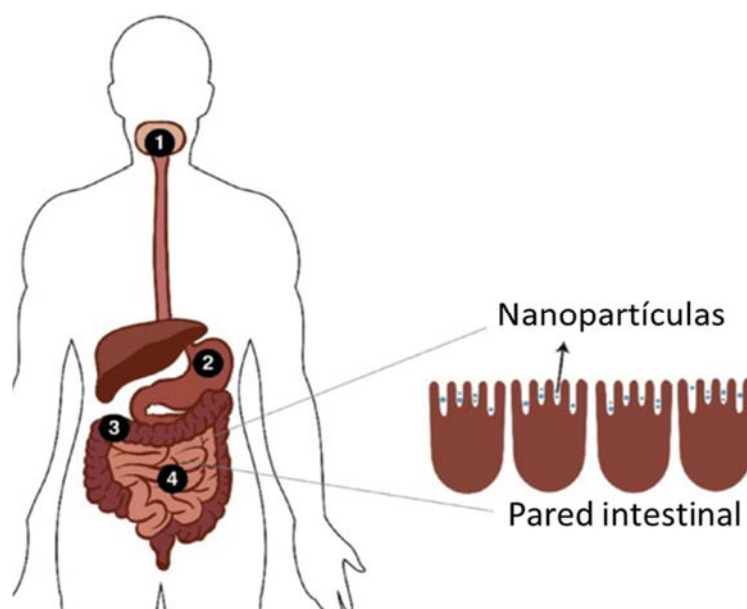


Figura 26. Diagrama esquemático representando las distintas fases de la digestión humana.

Mientras que los péptidos y los lípidos tienen una tasa de absorción intestinal aceptable, los polifenoles presentan relativa baja absorción a partir del tracto gastrointestinal, lo que limita sus efectos biológicos en el organismo. Se ha demostrado que la absorción intestinal de polifenoles y de sus metabolitos que circulan por el plasma es determinada por la estructura

química (D'Archivio et al., 2010). La biodisponibilidad de cada clase de polifenol es determinada por el peso molecular, su glicosilación y su esterificación. De este modo, muchos polifenoles contenidos en frutas y vegetales están glicosilados, afectando a su absorción en el intestino (Karaś et al., 2017). La encapsulación de estos compuestos polifenólicos y otros de diferente naturaleza en liposomas mejora su bioaccesibilidad y biodisponibilidad, mejorando su tasa de digestibilidad.

3.6. Técnicas experimentales

Se han aplicado diversas metodologías para caracterizar las propiedades tanto de los extractos bioactivos y los liposomas, así como de las matrices alimentarias empleadas como modelos de incorporación. A continuación se introducen brevemente los fundamentos de algunas de las técnicas más significativas de la presente Memoria.

Tamaño medio, polidispersidad y potencial Z mediante dispersión dinámica de luz en Zetasizer

El tamaño de partículas basadas en polímeros o coloides es un factor determinante en las propiedades de sistemas biológicos. La dispersión dinámica de luz es una de las técnicas más empleadas para medir el tamaño de partícula en soluciones o en dispersiones y para llevar a cabo estudios de distribución de tamaños. Se basa en las fluctuaciones desencadenadas por la difusión Browniana de partículas esféricas, donde el movimiento Browniano de las partículas está relacionado con el diámetro hidrodinámico. La técnica se emplea con mayor frecuencia para 1) estudios de estabilidad de formulaciones en función del tiempo y/o la temperatura, 2) identificar la presencia de agregados en diferentes formulaciones, y 3) la rápida determinación del tamaño de partícula de muestras monodispersas (Manaia et al., 2017).

Esta técnica utiliza una luz láser que incide sobre las partículas de una suspensión, provocando la dispersión de luz en todas las direcciones posibles. Estos haces de luz dispersados interfieren con los haces de las otras partículas y permiten obtener una intensidad de dispersión. Las partículas de una suspensión se encuentran en continua vibración como consecuencia del movimiento browniano (movimiento aparentemente aleatorio de las partículas suspendidas en un fluido, según Harrison (1985)), por lo que sus posiciones relativas están cambiando continuamente. Esto provoca que las condiciones de interferencia y la intensidad de dispersión varíen en función de estas vibraciones y posiciones relativas. La intensidad de luz dispersada detectada será ligeramente más alta o más baja que la de luz incidente original (debido al efecto Doppler: cambio de frecuencia aparente de una onda producido por el movimiento relativo de una fuente respecto a otra y que se puede medir por interferometría), dependiendo de la dirección en que se mueva la partícula con respecto al detector. De este modo, si las partículas se mueven rápidamente (partículas pequeñas) la intensidad de la dispersión se acelera pero si las partículas se mueven lentamente (partículas grandes) la intensidad se reduce (Cuadros-Moreno et al., 2014).

El tamaño medio se determina empleando un software específico, que calcula el coeficiente de difusión translacional aplicando la ecuación de Stokes-Einstein (Lee et al., 2010):

$$D_z = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_{t,avg}}$$

Donde D_z es el diámetro hidrodinámico, $D_{t,avg}$ es el coeficiente de difusión translacional, K_B es la constante Boltzmann, T es la temperatura termodinámica y η es la viscosidad dinámica.

Las dispersiones con nanopartículas suelen tener diversos tamaños de partícula, por lo que tienen diferentes coeficientes de difusión translacionales (Pecora, 2000). Al medir el tamaño de

partículas mediante esta técnica se obtiene el diámetro medio, la distribución de tamaños y el índice de polidispersidad, calculado mediante modelos matemáticos. Mediante el índice de polidispersidad se puede tener una idea de la diversidad de tamaños de partícula en la suspensión. Este índice oscila de 0-1, donde 0 es el valor para suspensiones completamente monodispersas (Zweers et al., 2003).

El potencial zeta es una característica de partícula fundamental también determinada mediante dispersión dinámica de luz, mediante microelectroforesis Doppler (Manaia et al., 2017). Las medidas de potencial zeta proporcionan un análisis preciso del estado electrónico de la superficie de las partículas, pudiendo ser utilizadas como indicador de la estabilidad de las suspensiones. La inestabilidad resulta de la interacción entre partículas no cargadas o débilmente cargadas, dando lugar a la formación de agregados.

Cuando las partículas entran en contacto con una solución acuosa, desarrollan una carga eléctrica debido a sus características iónicas. Cada partícula es rodeada por una capa de iones de carga opuesta pero equivalente conocida como capa de Stern. Este conjunto se encuentra envuelto por una capa difusa con iones de diferentes polaridades (Schultz et al., 2008). Estos iones permanecen ligados a la partícula durante todos sus desplazamientos en el medio acuoso, evitando colisiones con otras partículas de características similares y confiriendo estabilidad a la suspensión (Figura 27).

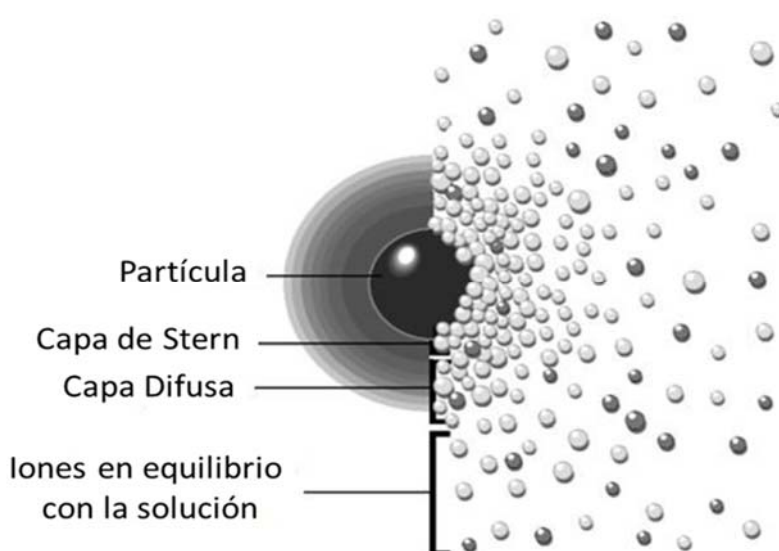


Figura 27. Esquema de la representación de la doble capa eléctrica de una partícula: la imagen izquierda muestra el cambio en la densidad de carga alrededor del coloide; la imagen derecha muestra la distribución de iones positivos y negativos alrededor del coloide cargado.

El potencial zeta se define como la carga electrostática que existe en el límite de la capa de Stern y la capa difusa, y se emplea como índice de estabilidad de partículas (Gustafsson et al., 2003). Al incrementarse el potencial zeta (positiva o negativamente) se incrementan las interacciones repulsivas y se reduce la frecuencia de las colisiones entre partículas, dando lugar a una mayor estabilidad de suspensión (Da Silva Malheiros et al., 2010). Valores de potencial zeta inferiores a -30 mV o superiores a +30 mV son indicativos de condiciones estables (Müller et al., 2001).

Microscopía electrónica de transmisión por criofijación

La microscopía electrónica de transmisión es una de las herramientas más útiles para la caracterización de nanomateriales a escalas espaciales para tamaños comprendidos desde el nivel atómico entre 1-100 nm hasta el nivel micrométrico, con diversas posibilidades de

aplicación. La técnica emplea un haz de electrones más potente que la microscopía electrónica de barrido, proporcionando mejor resolución y mayor detalle, permitiendo observar la estructura cristalina y granulometría de partículas. La imagen se forma a partir de los electrones transmitidos a través de la muestra, que se concentran en la lente, se detectan por una cámara y se muestran en una pantalla. La técnica de microscopía electrónica de transmisión es una herramienta muy importante en muchos campos de la nanotecnología, incluyendo la investigación de los transportadores de sustancias bioactivas. Además, permite la detección de alteraciones en la morfología de nanopartículas después de la incorporación de sustancias a distintas concentraciones (Manaia et al., 2017).

Una alternativa para mejorar la preservación de la morfología de la muestra es la microscopía electrónica de transmisión por criofijación, donde la muestra es fijada por congelación, disminuyendo los tratamientos invasivos de deshidratación o tinción típicos de la microscopía convencional (Manaia et al., 2017).

Calorimetría Diferencial de Barrido

La técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido nos aporta información útil sobre la naturaleza de los cambios termodinámicos (temperatura) y energéticos (entalpía) que están asociados a la transformación y reordenamiento de moléculas o compuestos cuando un material pasa de un estado energético a otro. Es decir, cuando una muestra se somete a una transición de fase, ésta experimenta una serie de cambios de temperatura y entalpía que pueden dar una idea de la composición y estructura del material.

Esta técnica es regularmente empleada en el análisis térmico de alimentos para la detección de pérdida de agua, desnaturalización proteica y cristalizaciones en las propiedades termofísicas de los constituyentes y su información es relevante para determinar y poder mejorar la calidad, seguridad y estabilidad del alimento. Una de sus aplicaciones más relevantes es el estudio de las transiciones de fase en emulsiones alimentarias (Farah et al., 2018). Esta técnica permite determinar la estabilidad térmica de los liposomas, lo que en parte se correlaciona con su aptitud como alimento funcional.

Reología dinámica oscilatoria

La reología es el estudio del flujo y deformación de la materia y usualmente se emplea para estudiar fluidos no newtonianos. Los polímeros son grandes macromoléculas que exhiben un comportamiento no newtoniano, donde el parámetro de viscosidad depende de la tasa de deformación. Además, son materiales viscoelásticos, es decir, que poseen propiedades tanto de un líquido viscoso como de sólidos elásticos, dependiendo del tiempo y condiciones de deformación (Aho et al., 2015). Los estudios reológicos dan información sobre el grado de consistencia y estabilidad de las matrices alimentarias, así como de la aptitud tecnológica de ingredientes y mezclas de compuestos para el procesado.

Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier

La Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier es una técnica espectroscópica vibracional que puede monitorizar los cambios en las estructuras moleculares, permitiendo detectar los cambios moleculares de una manera rápida y no invasiva de la muestra (Wei et al., 2018). Se basa en detectar las vibraciones naturales de las moléculas y de diferentes grupos funcionales. En función de la frecuencia exacta y de la intensidad (en absorbancia) a la que se detectan los diferentes grupos funcionales, se pueden deducir cambios en la composición y conformación estructural de las muestras. En esta técnica es aconsejable emplear muestras

secas o con un bajo contenido en agua, puesto que el agua (externa o en solución) también refleja vibraciones moleculares y puede inducir a errores en la determinación de los resultados.

Resonancia Magnética Nuclear de Protón de Bajo Campo

La resonancia magnética nuclear de baja resolución es una técnica apreciada y útil en la ciencia y tecnología de los alimentos, permitiendo la investigación de las relaciones entre las propiedades de los alimentos y su composición y estructura, a través del intercambio de protones (esencialmente relacionados con la estructura de las moléculas de agua). Es adecuada para el estudio de las propiedades dinámicas de la materia, tales como difusión, flujo y relajación (Capitani et al., 2017). Los dos principales fenómenos de relajación en resonancia son la relajación longitudinal, caracterizada por T_1 , y la relajación transversal, caracterizada por T_2 .

Esta técnica, basada en el magnetismo nuclear es un método no invasivo y no destructivo que no requiere ningún tipo de preparación de la muestra (Kirtil & Oztop, 2016), lo que amplía enormemente su posibilidad de aplicaciones relacionadas con los alimentos.

Test de adherencia y mucoadhesividad

La bioadhesión es una propiedad muy importante de las membranas biológicas. La mucosa oral está constituida principalmente de mucinas, glicoproteínas con funciones adherentes capaces de atrapar nutrientes y una amplia variedad de compuestos (Laurén et al., 2018). De este modo, la capacidad de adherencia y mucoadhesividad de los polímeros que conformen las películas facilitaría la retención de ingredientes activos en las mucosas (Cook et al., 2018), favoreciendo la incorporación de nutrientes (o bioactivos) vía oral y sublingual, que pasarían directamente al torrente sanguíneo. Pero también puede ser un mecanismo para evaluar la adhesión y mucoadhesión de determinados compuestos o estructuras en otras mucosas, por ejemplo las intestinales, vaginales, nasales, etc.

El test de adherencia representa la fuerza máxima necesaria para despegar un artefacto de superficie plana de la película mientras que el test de mucoadhesividad es un procedimiento similar pero donde se aplica una capa de mucina (proteína glicosilada procedente de las secreciones mucosas) entre la película y la superficie del artefacto, de manera que se crea contacto entre mucina y película.

Test de tracción

La resistencia mecánica se considera una aptitud muy importante en las películas elaboradas a partir de polímeros naturales, ya que de ella depende que la película pueda romperse o fracturarse, limitando así su función, sobre todo si la finalidad de la misma es ser utilizada como embalaje o envoltorio de otros alimentos. La resistencia de una película dependerá de factores como son la composición del polímero, la adición de fluidificantes, el estado de hidratación final de la película, etc.

El test de tracción permite determinar la resistencia mecánica de las películas mediante la cuantificación de la fuerza de tensión, fuerza máxima necesaria para romper una película sometida a estiramiento, y la elongación, distancia máxima de estiramiento alcanzada por la película antes de su rotura como consecuencia de dicho estiramiento.

Estabilidad oxidativa por el método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

Las especies reactivas de oxígeno, moléculas altamente reactivas responsables de la oxidación lipídica y la descomposición oxidativa de ácidos grasos insaturados (Qian et al., 2008), son

eliminados, en condiciones normales, por los sistemas de defensa antioxidante del organismo, tanto enzimáticos (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa) como no enzimáticos (vitamina E, vitamina C, glutatión). Sin embargo, en condiciones patológicas se rompe el equilibrio entre generación y eliminación de especies reactivas de oxígeno, incrementándose la generación incontrolada de radicales libres, responsables del deterioro de lípidos de membrana, biomacromoléculas (ADN) y proteínas, desencadenando trastornos como diabetes mellitus, cáncer, y enfermedades cardiovasculares, inflamatorias o neurodegenerativas (Johansson et al., 2010). Por ello es necesario el consumo de fuentes antioxidantes externas para evitar el estrés oxidativo (Ratnam et al., 2006).

El fundamento de esta técnica radica en que el malonaldehído, sustancia capaz de reaccionar con el ácido tiobarbitúrico, es un producto resultado de la oxidación lipídica y posee un color rosa, tanto más intenso cuanto más compuesto hay. Las sustancias antioxidantes son capaces reducir este contenido en malonaldehído y por tanto la tonalidad rosácea, indicando un menor grado de oxidación lipídica. Esta variación de color puede ser cuantificada por métodos espectrofotométricos.

Análisis sensorial

El análisis sensorial es una técnica que utiliza personas que, mediante el uso de sus sentidos (gusto, olfato, vista, oído y tacto), identifican y evalúan las propiedades organolépticas de alimentos. Se utiliza frecuentemente como control de calidad, pero es una herramienta francamente útil en el desarrollo de alimentos, en el cual permite caracterizar los atributos que van a marcar en especial un alimento o que se desean enfatizar en especial; incluso para estudios de comercialización, rivalidad entre marcas o cuotas de mercado es cada día más frecuente.

Este tipo de análisis se puede afrontar mediante tres tipos de aspectos bien diferenciados:

1. Discriminación: cuando las preguntas al evaluador pretenden establecer diferencias o no entre dos o más productos. Cobran especial importancia en el Análisis de Control de Calidad de Productos y Estudios de Vida Útil.
2. Descripción: cuando se pretende identificar y medir las diferencias entre productos. Muy conveniente en el Desarrollo de Productos, reformulación o modificación de productos ya existentes.
3. Preferencia o hedónicas: se persigue conocer el grado de agrado o aceptabilidad. Tiene como objetivo establecer el grado de satisfacción de los productos en el consumidor (Carpenter et al., 2000).

El tipo de análisis sensorial llevado a cabo en este trabajo es un análisis de descripción. Para la realización del análisis sensorial es conveniente definir qué descriptores son los que mejor van a definir las características que se desean evaluar en el producto o ingrediente concreto, llevándose a cabo mediante unas pruebas descriptivas con un panel entrenado de jueces que nos permitan apreciar qué parámetros y en qué medida se modifican en un alimento por la introducción en la formulación de este tipo de encapsulados. Entre los aspectos más comunes cabe destacar el sabor, la textura, el olor, etc. Sin embargo, en función de las características del alimento a valorar, los atributos estudiados pueden variar. Por ejemplo, para el análisis sensorial de películas se considera que deberían tenerse en cuenta parámetros como la adherencia en boca, el grado de salivación, el tiempo de disolución en boca, palatabilidad, etc.

No se han encontrado hasta el momento estudios publicados sobre las propiedades organolépticas de los liposomas como ingredientes alimentarios en diferentes alimentos; probablemente estos estudios hayan sido llevados a cabo a nivel industrial.

Actividad antioxidante

Sería deseable establecer y estandarizar métodos que puedan medir el nivel total de capacidad antioxidante directamente, principalmente a partir de extractos que contienen compuestos fenólicos, u otros compuestos fuertemente antioxidantes, pero frecuentemente los extractos son complejos y tienen más de una especie en su composición. Lo más frecuente es tratar de determinar esta actividad mediante diversas aproximaciones o ensayos que nos permitan apreciar diversos mecanismos de capacidad antioxidante del material en su conjunto. Los ensayos de capacidad antioxidante se pueden clasificar en general como ensayos basados en transferencia de electrones (ET) y transferencia de átomos de hidrógeno (HAT).

La mayoría de los ensayos HAT están basados en la cinética e implican un esquema de reacción competitivo en el que el antioxidante y el sustrato compiten por los radicales peróxido generados térmicamente a través de la descomposición de compuestos azoicos. Los ensayos basados en transferencia de electrones miden la capacidad de un antioxidante en la reducción de un oxidante, que cambia de color cuando se reduce. Los ensayos de transferencia de electrones incluyen ABTS / TEAC, Métodos CUPRAC, DPPH, Folin-Ciocalteu y FRAP, cada uno utilizando diferentes reactivos redox cromogénicos con diferentes potenciales estándar.

Método de fotoquimioluminiscencia

La fotoquimioluminiscencia combina la rápida generación de radicales libres con la alta sensibilidad para su detección lumínica. Este método mide la capacidad de los antioxidantes de unirse al radical superóxido tanto en ambientes liposolubles como hidrosolubles. La excitación mediante irradiación (UV) de la sustancia fotosintetizadora (luminol) produce radicales libres (radical superóxido), radicales que serán parcialmente eliminados al reaccionar con los antioxidantes presentes en la muestra. El resto de los radicales libres producen luminiscencia al reaccionar con el luminol (doble papel), luminiscencia que se mide en el detector presente en el equipo (tubo fotomultiplicador). Por tanto cuanto más luminiscencia sea detectada menor será la capacidad antioxidante.

Actividad antioxidante por el método de secuestro de radicales libres (ABTS)

El fundamento de esta técnica radica, según Zulueta et al. (2009), en que el ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS) en presencia de persulfato potásico ($K_2S_2O_8$) es oxidado, formando el radical $ABTS^+$, cromatóforo que presenta una coloración verde-azulada. Pero hay sustancias antioxidantes que son capaces de reducir el $ABTS^+$, es decir, revertir la reacción de oxidación y de esta manera provocar la pérdida de coloración del reactivo $ABTS^+$. Esta pérdida de coloración puede ser medida por espectrofotometría visible y así cuantificar la capacidad antioxidante de una sustancia.

Actividad antioxidante por el método del poder reductor del hierro (FRAP)

El fundamento de esta técnica se basa, acorde a Benzie & Strain (1996), en que el complejo Fe^{3+} -tripiridiltriazina (incoloro) puede ser reducido por una sustancia antioxidante a Fe^{2+} -tripiridiltriazina (coloreada). Esta aparición de color, la cual representa una mayor reducción y por tanto una mayor capacidad antioxidante, puede ser medida y cuantificada por espectrofotometría.

Actividad antioxidante por el método del contenido de sustancias reactivas al Folin-Ciocalteu

Esta técnica se basa, como indicó previamente Slinkard & Singleton (1977), en que el reactivo de Folin presenta un color amarillento debido a la presencia en su composición del ácido fosfomolibdotúngstico. Este reactivo puede interaccionar con diversas sustancias antioxidantes, las cuales reducen el color amarillo en favor de una coloración azulada. Este cambio de color

puede ser medido por espectrofotometría y la actividad antioxidante de la sustancia cuantificada.

Actividad antihipertensiva por el método de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina

La enzima convertidora de angiotensina es capaz de convertir la angiotensina I (inactiva) en angiotensina II (activa). Esta hormona activa es un decapeptido con acción vasoconstrictora de arteriolas y vénulas y además provoca, a través de la aldosterona, la reabsorción de agua y sodio y la excreción de potasio. Estos dos mecanismos conducen a un incremento de la presión arterial y con ello un aumento del riesgo de enfermedades cardiovasculares, como puede ser la hipertensión (Kim et al., 2001). Sin embargo, existen compuestos antihipertensivos capaces de reducir la actividad de la enzima convertidora de angiotensina y por tanto la hipertensión.

El método utilizado para medir la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) *in vitro* ha sido el descrito por Wu et al. (2002), que se basa en la cuantificación mediante fase reversa en cromatografía de alta eficacia (RP-HPLC), a 228 nm, del ácido hipúrico formado al incubar el sustrato Hipuril-Histidil-L-Leucina (HHL) con la ACE, en presencia o no de sustancias inhibitoras. La cantidad de ácido hipúrico formado, es relacionada con la capacidad de la muestra estudiada para inhibir la actividad de la enzima.

Actividad hipoglucémica por el método de inhibición de la enzima dipeptidil peptidasa IV

La hiperglucemia es el indicador más habitual de la diabetes, enfermedad consistente en un conjunto de trastornos metabólicos, presentando complicaciones a diversos niveles y en distintos aparatos: pérdida de visión, problemas renales, dificultad en la circulación de la sangre y riesgo de enfermedad coronaria e infarto, problemas de irrigación intestinal, etc. Esta enfermedad está relacionada directamente con los niveles elevados de glucosa en sangre, consecuencia de una deficiencia de insulina (diabetes tipo I) o resistencia a insulina (diabetes tipo II).

Esta técnica se basa en la inhibición por parte de la enzima dipeptidil peptidasa IV de dos hormonas: el péptido similar al glucagón y el péptido inhibidor gástrico. Estas hormonas incretínicas favorecen el control glucémico regulando los niveles de insulina (Maes et al., 2007) evitando o disminuyendo enfermedades como la diabetes. Por tanto, a mayor actividad de la enzima mayor será la inhibición de estas hormonas y mayores los problemas relacionados con la glucemia. Existen ciertos compuestos capaces de inhibir esta enzima y por tanto reducir los problemas insulínicos asociados. El uso de inhibidores naturales, como péptidos de origen animal en este caso, tiene la ventaja de evitar los efectos secundarios ocasionados por los inhibidores artificiales.

4. HIPÓTESIS

La sociedad actual demanda alimentos naturales, saludables, seguros y funcionales. Existen diversas estrategias para la obtención de este tipo de alimentos, siendo una de ellas la encapsulación de compuestos bioactivos en estructuras que permitan su protección y conservación. Por este motivo, la nano-encapsulación en liposomas podría ser una buena estrategia, apoyada recientemente por la Política Europea de nuevos alimentos. Estas estructuras ofrecen la posibilidad de vehiculizar cualquier sustancia bioactiva al interior del organismo y también de ser incorporadas en sistemas alimenticios, pudiendo dar lugar a alimentos alternativos que permitan que los bioactivos manifiesten su actividad llegado el momento.

Por otro lado, el aprovechamiento de especies vegetales infrautilizadas y de residuos del sector agroindustrial y pesquero como fuente de compuestos bioactivos constituye una estrategia atractiva dentro del programa europeo de economía circular y de sostenibilidad de los recursos naturales.

Por ello, planteamos el diseño y desarrollo de un ingrediente funcional basado en liposomas de fosfatidilcolina parcialmente purificada procedente de la soja conteniendo diversos extractos de origen animal o vegetal con propiedades potencialmente beneficiosas para la salud humana a partir de residuos o especies infrautilizadas, los cuales pueden ser incorporados en matrices alimentarias para la obtención de alimentos funcionales de alto valor añadido.

5. OBJETIVOS

Objetivo principal

El objetivo principal de esta Memoria es la elaboración y caracterización de liposomas de fosfatidilcolina de soja parcialmente purificada para encapsular extractos bioactivos de diferente naturaleza y composición (peptídica, polifenólica y lipídica), obtenidos a partir del aprovechamiento de materias primas infrautilizadas e infravaloradas, o de residuos procedentes del sector agroindustrial y pesquero. Dichos liposomas, una vez demostradas sus adecuadas propiedades de partícula y su estabilidad, serán objeto de incorporación en dos tipos modelo de matrices alimentarias a modo de alimento funcional: (i) productos pesqueros tipo gel y (ii) películas comestibles.

Objetivos parciales

1. Obtención y caracterización físico-química de fosfatidilcolina de soja parcialmente purificada y evaluación de su aptitud para la formación de liposomas.
2. Obtención y caracterización química y biológica de extractos bioactivos de diferente naturaleza, procedentes de fuentes naturales infrautilizadas o residuos del sector agroindustrial y pesquero.
3. Encapsulación de los extractos bioactivos en liposomas, caracterización de sus propiedades físico-químicas y biológicas, y estudio de estabilidad en el tiempo en forma de dispersión liposomal o como liposomas liofilizados.
4. Estudio de la absorción intestinal de los compuestos bioactivos encapsulados en liposomas tras la digestión gastrointestinal *in vitro* y *ex vivo*.
5. Evaluación del comportamiento de los liposomas frente a diferentes estrategias tecnológicas y de su efecto sobre la capacidad de gelificación del músculo de merluza.
6. Formulación de reestructurados de surimi de calamar con extractos bioactivos encapsulados en liposomas. Caracterización, estabilidad y bioaccesibilidad de los extractos bioactivos tras la digestión gastrointestinal simulada.
7. Evaluación de la integridad estructural, efecto mucoadhesivo y propiedades organolépticas de películas bucodispersables de caseinato sódico enriquecidas con liposomas bioactivos.
8. Evaluación del efecto de la incorporación de liposomas bioactivos en películas comestibles de carboximetilcelulosa, así como de la integridad de liposomas y bioaccesibilidad del bioactivo tras la digestión gastrointestinal simulada.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1. Purificación de fosfatidilcolina

Se parte como materia prima inicial de lecitina de soja (LS), compuesto natural obtenido del proceso de producción y refinado del aceite de soja (*Glycine max*). A partir de LS se obtendrá, mediante un proceso de purificación con lavados sucesivos de acetona, dos fosfatidilcolinas parcialmente purificadas, de 2 (FC2) y 5 lavados (FC5). La composición, el perfil lipídico y las propiedades físicas de estas tres materias primas (LS, FC2 y FC5) se caracterizaron con el objetivo de encontrar un material encapsulante con las propiedades adecuadas para la elaboración de liposomas. La lecitina de soja fue seleccionada debido a su composición rica en ácidos grasos poliinsaturados, que determinarán la formación de una bicapa lipídica de fosfolípidos con propiedades saludables. Desde el punto de vista industrial podría ser interesante elaborar liposomas a partir de lecitina de soja directamente, pues por un lado se evitaría el coste de la purificación de los fosfolípidos y por otro el rendimiento sería del 100 %. No obstante, hay que evaluar los componentes que constituyen el liposoma y las propiedades que confieren.

6.2. Estandarización de liposomas

En la búsqueda del material encapsulante más adecuado y tratando de determinar si en la conformación del liposoma influyen las propiedades de las materias primas ensayadas, se elaboraron diferentes formulaciones liposomales con las tres materias primas (LS, FC2 y FC5). Además, con la finalidad de estandarizar el proceso de fabricación de liposomas, se tuvieron en cuenta otros parámetros en su elaboración, como son las condiciones del método de sonicación (A: fuerte y prolongada o B: débil y corta) y la adición o no de un crio-protector (ng: sin glicerol), obteniendo así un total de 6 muestras (LLS, L2A, L2B, L5A, L5B, L5Ang). Tras analizar las características de partícula y las propiedades físicas de los liposomas, tanto como dispersiones liposomales como en estado seco (liofilizados), sólo uno de ellos fue seleccionado como preparación liposomal estándar en base a sus excelentes características, L5A, por lo que a partir de este momento todos los liposomas fueron elaborados siguiendo dicho protocolo.

Acorde al actual Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea relativo a los nuevos alimentos, la definición de nuevo alimento podrá incluir los alimentos en forma de micelas o liposomas, éstos últimos consistentes en vesículas muy apropiadas para vehiculizar cualquier sustancia al interior del organismo. La fosfatidilcolina a partir de la cual se elaboran los liposomas posee una composición altamente rica en ácidos grasos insaturados (mono- y poliinsaturados), compuestos de gran interés para formar parte de un alimento funcional. Sin embargo, también pueden ser responsables de la rancidez del alimento, por lo que se estudiará si la conformación en liposomas modifica la estabilidad frente a la rancidez.

6.3. Extractos bioactivos procedentes de residuos

Varios extractos bioactivos de distinta naturaleza y procedencia se obtuvieron mediante diversos procesos de extracción: un extracto peptídico basado en un hidrolizado de colágeno (HC) procedente de tónicas de piel y manto del calamar gigante *Dosidicus gigas*, un extracto peptídico basado en una fracción <1 kDa (FP1) procedente del langostino *Penaeus notialis* (sin valor comercial), un extracto polifenólico procedente de piel y albedo de la granada (PG) *Punica granatum*, un extracto polifenólico (tanto en fase acuosa como etanólica) procedente de las partes aéreas de la planta de hinojo marino (HM) *Crithmum maritimum* (especie infrautilizada) y un extracto lipídico obtenido de grasa de crustáceo (GC) rica en astaxantina procedente de residuos (cutículas, cefalotórax, pleópodos, parápodos y telsons) del langostino *Litopenaeus vannamei*.

Se consideró de interés la selección de compuestos bioactivos en base a su diferente naturaleza química, dado que se prevé distinto comportamiento frente a la encapsulación en liposomas de

fosfatidilcolina, confiriendo distintas propiedades físico-químicas y biológicas, así como distinta aptitud, tanto para su conservación como para su posible aplicación alimentaria.

Para poder ahondar en los mecanismos de actuación de cada uno de los extractos ensayados, los compuestos activos principales en los extractos polifenólicos y en el lipídico, y la distribución de pesos moleculares en el hidrolizado y la fracción peptídica, se determinaron mediante columnas de exclusión de tamaño molecular (para los extractos peptídicos), columnas en fase reversa (para los extractos polifenólicos) y cromatografía de gases/espectrometría de masas (para los extractos lipídicos). Además del estudio de la composición y perfil de aminoácidos de los hidrolizados peptídicos y la posible citotoxicidad de los extractos polifenólicos en células Caco-2 diferenciadas, se cuantificó el potencial bioactivo de los extractos a través de algunas de sus actividades funcionales, tales como la actividad antioxidante caracterizada por diversos métodos como capacidad de secuestrar radicales libres (ABTS) (HC, PG, GC, HM y FP1), poder reductor del ion hierro (FRAP) (HC, PG, GC y HM), contenido de sustancias reactivas al Folin-Ciocalteu (HC, PG, GC y HM) y capacidad de secuestrar el anión superóxido determinado por fotoquimioluminiscencia (HC, PG y GC); antihipertensiva por el método de la enzima convertidora de angiotensina (HC, PG, GC y FP1) e hipoglucémica por el método de la enzima dipeptidil peptidasa IV (FP1). Estas actividades se seleccionaron en base a la buena aptitud que presentan los polifenoles y carotenoides frente a las propiedades antioxidantes, y los péptidos bioactivos frente a las otras propiedades biológicas seleccionadas, de manera que permiten realizar un seguimiento de su comportamiento en los diversos procesos.

6.4. Desarrollo de liposomas rellenos con bioactivos

Basándonos en el protocolo elegido (L5A), se encapsularon los diferentes extractos bioactivos para mejorar su eficacia y biodisponibilidad, permitiendo obtener así un producto o ingrediente funcional con propiedades potencialmente beneficiosas para la salud.

De este modo, se obtuvieron las formulaciones liposomales: L-HC, L-PG, L-GC, L-HM (L-HM acuoso y L-HM etanólico) y L-FP1. La concentración de bioactivo, referida respecto a la fosfatidilcolina, fue diferente en función de la formulación y diseño experimental: 4 % en L-HC, L-PG y L-GC; 10 % en L-FP1; y 8, 16, 32 y 64 % en L-HM acuoso y L-HM etanólico, haciendo un total de 12 liposomas distintos. Tres de ellos (L-HC, L-PG y L-GC) se estudiaron en detalle analizando, tanto en forma de dispersión liposomal como en estado liofilizado, las propiedades físico-químicas y estructurales, y las actividades biológicas. Además, estos liposomas se conservaron y caracterizaron durante 4 semanas a 4 °C como dispersión liposomal (en estado líquido) y durante 7 meses a -20 °C en estado liofilizado (seco), para evaluar su estabilidad físico-química en el tiempo. Por su parte, se determinaron las características de partícula de las suspensiones liposomales conteniendo la fracción peptídica <1 kDa de langostino (L-FP1) y el extracto de hinojo marino (L-HM), así como las características de partícula, propiedades físico-térmicas y actividades biológicas de los liposomas liofilizados que incorporaban el último extracto (L-HM). Al igual que para los extractos bioactivos, se determinó el posible efecto citotóxico de los liposomas encapsulando extractos polifenólicos.

6.5. Absorción intestinal

Con el objetivo de estudiar la bioaccesibilidad y permeabilidad intestinal de los liposomas y/o de los extractos, se llevó a cabo un ensayo de absorción intestinal con células Caco-2 para el extracto de hinojo marino acuoso (HM-acuoso) y su correspondiente liposoma (L-HM-ac 64), antes y después de ser sometidos a digestión gastrointestinal *in vitro*.

6.6. Aplicación en alimentos

Se llevaron a cabo dos estrategias para incorporar los liposomas en matrices alimentarias como modelos de producto funcional de alto valor añadido. Las estrategias consistieron en la

incorporación de liposomas en (i) matrices de músculo de origen pesquero como modelos para la obtención de reestructurados y (ii) polímeros naturales de naturaleza proteínica y de fibra como modelos para evaluar su comportamiento en el desarrollo y obtención de películas comestibles.

Aplicación de liposomas en reestructurados: músculo de merluza

Se estudiaron previamente diversos métodos de estabilización de los liposomas, los cuales se incorporaron posteriormente en homogenizados de músculo de merluza para evaluar su aptitud en productos gelificados.

Los liposomas vacíos, previamente estabilizados mediante diferentes tratamientos tecnológicos (alta presión *AP*, congelación-descongelación *CD*, liofilización *LF*, atomización *A*, adición de glicerol *G* o adición de trealosa *T*), se caracterizaron y posteriormente se incluyeron en dos músculos de merluza fresca (*Merluccius merluccius*) de distinta calidad proteica (M1 de alta calidad y M2 de baja calidad). De esta forma se obtuvieron varios sistemas modelo a partir de M1 (MC 1, F, AP, CD, CD-G, LF, LF-G, A) y otros a partir de M2 (MC 2, CD-T, LF-T), de los cuales se evaluaron sus propiedades físico-químicas, estructurales y gelificantes.

Aplicación de liposomas en reestructurados: surimi de calamar

Se incorporaron liposomas encapsulando diferentes bioactivos en sistema modelo de surimi de calamar para su gelificación. Se evaluó la estabilidad de los geles frente a la conservación en estado congelado, así como la bioaccesibilidad de los bioactivos añadidos tras una digestión gastrointestinal simulada.

Los liposomas liofilizados encapsulando extractos bioactivos (L-HC, L-PG y L-GC) se incorporaron en un homogenizado de surimi de calamar gigante (*Dosidicus gigas*), obteniéndose los correspondientes geles tras calentar a 90 °C: G-L-HC, G-L-PG y G-L-GC. Un control sin liposomas (G) y un control con liposomas vacíos (G-L-V) para estudiar el potencial del bioactivo en la matriz se desarrollaron en paralelo. Se diseñó también una formulación alternativa basada en incorporar los bioactivos directamente en el homogenizado de surimi, sin encapsular (G-HC, G-PG, G-GC) para determinar la importancia de la cápsula en la formulación. Se analizaron las propiedades físicas y mecánicas de los geles para estudiar la interacción entre los tres componentes (bioactivo, cápsula y matriz). Los geles de surimi con liposomas se conservaron durante 7 meses en congelación (-20 °C) para estudiar su estabilidad físico-química en el tiempo. Además, todos los geles se sometieron a una digestión gastrointestinal *in vitro*, para estudiar la actividad (antioxidante) de la fracción soluble (digerible) de los mismos, con el objetivo de evaluar la bioaccesibilidad de los extractos incorporados, ya sea en forma libre o mediante encapsulados en liposomas, en la matriz de surimi.

Aplicación de liposomas en películas de caseinato sódico

Con objeto de evaluar el grado de integridad, las características de mucoadhesividad y las propiedades sensoriales de películas con liposomas, se adicionaron liposomas conteniendo la fracción peptídica de langostino <1 kDa (L-FP1) en la formulación de películas de caseinato sódico (P-L-FP1).

Un control sin liposomas (P) y un control con liposomas vacíos (P-L-V) se estudiaron en paralelo para determinar el efecto de los liposomas y del bioactivo en la formulación. El objetivo fue elaborar películas funcionales con el fin de ser ingeridas directamente sin tener la función de recubrir, y donde el bioactivo sea absorbido a nivel bucal y sublingual pasando directamente desde la boca al torrente sanguíneo, por lo que se requiere unas propiedades de fácil y rápida

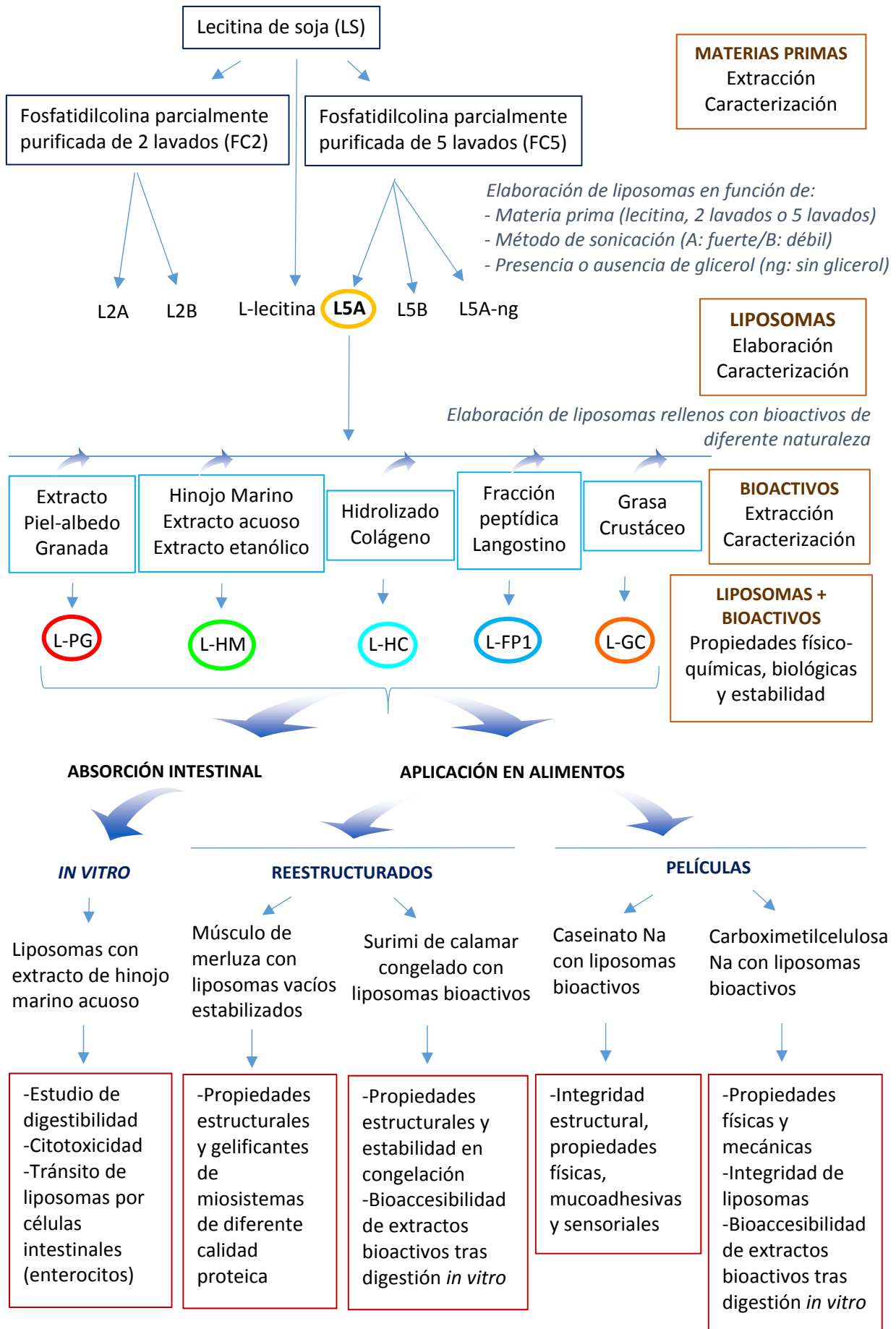
disolución. Se estudiaron las propiedades físicas, mecánicas, y organolépticas (a través de un análisis sensorial con un panel de jueces entrenados) de las películas.

Aplicación de liposomas en películas de carboximetilcelulosa

Las películas habitualmente requieren de un plastificante para adquirir las propiedades características de flexibilidad. Parte del diseño consistió en plantear si el plastificante, en este caso el glicerol, podía ser añadido al liposoma para estabilizarlo, evitando añadirlo en la película nuevamente, o bien ser adicionado en la película de manera directa, evaluando por tanto el comportamiento y propiedades de las películas resultantes. Además, dado que se pretendía utilizar la película a modo de recubrimiento comestible de otro alimento de baja humedad (como material envolvente), las películas se sometieron a una digestión gastrointestinal *in vitro* con el objetivo de estudiar la bioaccesibilidad de los bioactivos, determinando al mismo tiempo si los liposomas son resistentes al proceso de digestión.

Dispersiones liposomales incorporando el hidrolizado de colágeno (L-HC) se incluyeron en películas de carboximetilcelulosa sódica. Previamente, se determinó el efecto del bioactivo y del glicerol en la formulación liposomal, estudiando las características de partícula de liposomas vacíos y rellenos con y sin glicerol (L-V, L-V-G, L-HC y L-HC-G). Seguidamente, se incorporaron los dos liposomas con el hidrolizado de colágeno (L-HC y L-HC-G) en las películas (P-L-HC+G y P-L-HC-G). Dos películas control sin liposomas se elaboraron y se estudiaron en paralelo (P+G y P+G+HC). Se analizaron las propiedades físicas y mecánicas de las películas, así como su capacidad antihipertensiva. La fracción digerida de las películas, junto con la obtenida de la digestión de los liposomas, permitió determinar, mediante dispersión dinámica de luz en Zetasizer y microscopía electrónica de transmisión por criofijación, en qué medida los liposomas son resistentes al proceso de digestión.

El esquema representativo del diseño experimental llevado a cabo en esta Memoria se muestra en la figura 28.



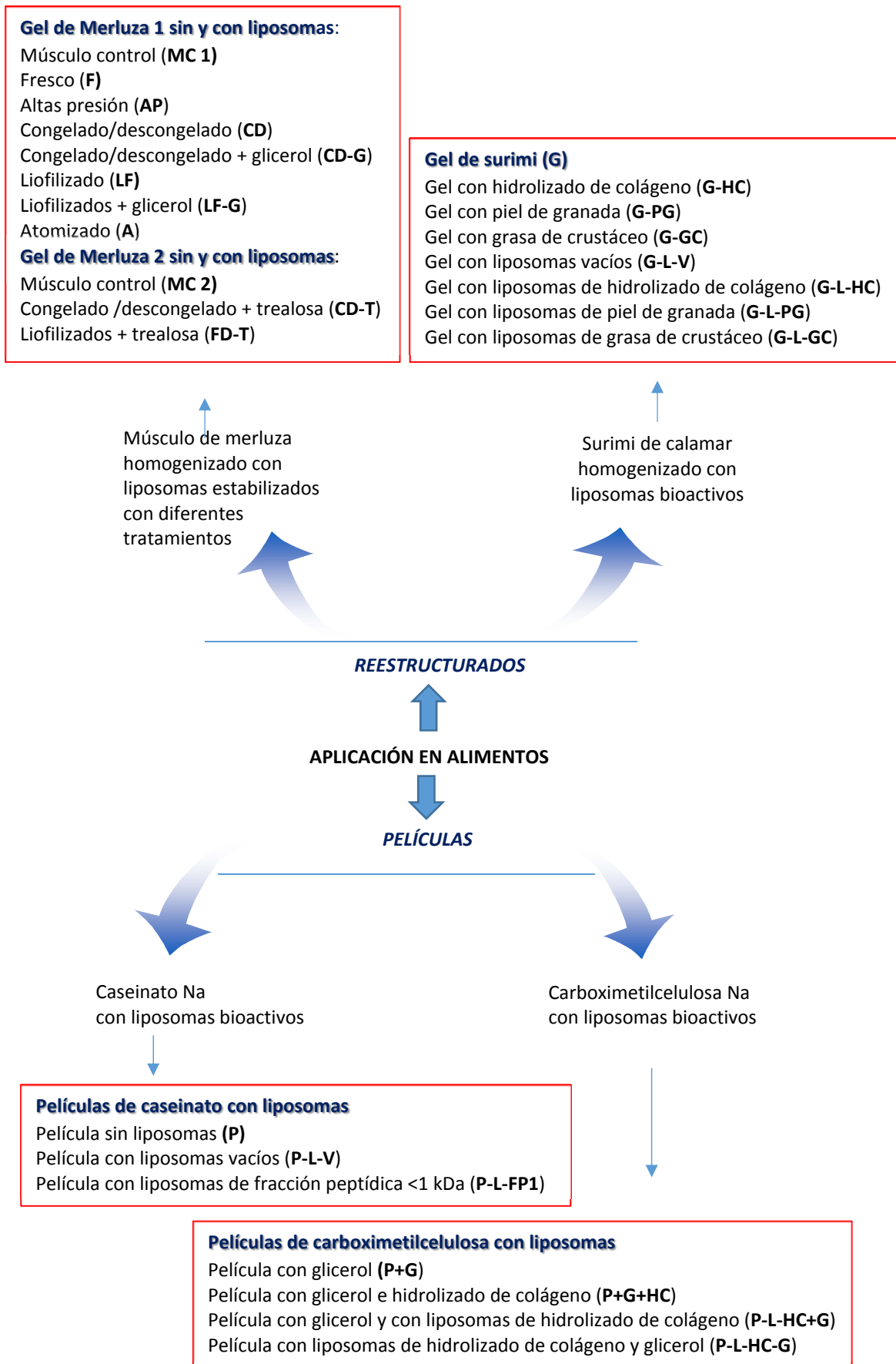


Figura 28. Esquema representativo del diseño experimental.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Obtención de las materias primas

Purificación de fosfatidilcolina

La obtención de un extracto de fosfolípidos rico en fosfatidilcolina se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Mosquera et al. (2014), con ligeras modificaciones. La lecitina de soja (*Glycine max*), comprada en Manuel Riesgo S.A. (Madrid, España), se homogenizó con acetato de etilo (1:5, w/v) hasta que ésta adquirió una textura gomosa. Entonces, se incorporó agua desionizada (7,5:1, w/v) hasta la formación de dos fases diferenciadas, descartándose la superior. El extracto se mezcló con acetona (1:2, w/v) con agitación continua durante 30 min (1 lavado), reponiendo la acetona con cada nuevo lavado. El precipitado obtenido se secó en un desecador a 20 °C bajo condiciones de vacío y oscuridad. Finalmente, la fosfatidilcolina parcialmente purificada se molió en Osterizer (Par Sunbeam, mod. 4153-50, México) hasta obtener un polvo fino y homogéneo, y se conservó a -20 °C hasta su uso.

7.2. Obtención de los extractos bioactivos

Extracto de piel y albedo de granada (PG)

Pieles y albedos de granada (*Punica granatum*), obtenidos en un mercado local, se secaron en estufa a 50 °C hasta peso constante y posteriormente se molieron en Osterizer hasta obtener un polvo fino. La extracción polifenólica se llevó a cabo según Basiri et al. (2015), con ligeras modificaciones. Este polvo se mezcló en una proporción 1:20 (p/v) con una solución etanol/agua (70/30) en un baño de agua a 40 °C y agitación continua (200 rev/min) durante 4 horas. A continuación, se dejó reposar a 21 °C durante 16 horas. Entonces, el extracto se centrifugó a 12000 g y 4 °C durante 15 min (Sorvall RC-5B, Sorvall Instruments) y después se filtró por filtros Whatman No.1. Finalmente, se rotaevaporó (Rotavapor R-300, BÜCHI, Suiza) a 40 °C hasta eliminar el solvente y se conservó a -20 °C hasta su uso.

Extracto de hinojo marino (HM)

Hinojo marino (*Crithmum maritimum*) proporcionado por la empresa Porto-Muñíos, S.L. (Cerceda, La Coruña, España), previamente descongelado y triturado en Thermomix (Vorwerk & Co., Wuppertal, Alemania) a intensidad 8, durante 2 min, se homogenizó con una mezcla etanol/agua (70/30) en una proporción 1:20 (p/v) y se mantuvo a 60 °C en baño de agua durante 30 min. A continuación, se sonicó (Q700 sonicator, Qsonica, Newton, CT, EEUU) a 95 % (114 W) 5 min con un pulso discontinuo (2,5 min + 1 stop + 2,5 min). El extracto, tras atemperarse 10-15 min, se centrifugó a 12000 g y 4 °C durante 15 min, y el sobrenadante resultante se filtró dos veces a vacío en un matraz Kitasato con filtros Whatman No.1. Entonces se rotaevaporó a 60 °C hasta eliminar el solvente y se liofilizó, para finalmente conservarse a -20 °C hasta su uso, lo que constituyó el extracto etanólico de hinojo.

Por otra parte, a partir de hinojo marino se obtuvo también un extracto acuoso, siguiendo el mismo procedimiento, con las siguientes excepciones: el hinojo se homogeneizó únicamente con agua desionizada y no fue necesario el paso de rotaevaporación, pues no había ningún solvente orgánico que eliminar, conservándose igualmente liofilizado a -20 °C.

Hidrolizado de colágeno de calamar (HC)

Túnicas de calamar (*Dosidicus gigas*), adquiridas en la industria (PSK Océanos S.A. Pozuelo de Alarcón, Madrid, España), se solubilizaron con ácido acético 0,5 M (1,7:10, p/v) a 3 °C y bajo agitación continua (AGV-8 Stirrer, Bunsen, Madrid, España) durante 96 horas. El colágeno soluble en ácido obtenido se congeló a -80 °C y se liofilizó (VirTis mod. 6K BTEL-85 con bomba

TRIVAC E2). Seguidamente, el liofilizado se disolvió en agua desionizada (30 %, p/v) para ser sometido a hidrólisis enzimática a 50 °C durante 3 horas utilizando Alcalasa 2,4 L (2,64 AU/g, EEUU), comprada en Sigma Aldrich (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EEUU), con una proporción enzima-substrato de 1:90, p/p, de acuerdo a Alemán et al. (2011a). La reacción se llevó a cabo en un pH-stato (TIM 856, Radiometer analytical, Villeurbanne, Francia) a pH constante (pH 8) mediante la adición continua de una solución de NaOH 0,1 N. Acto seguido, la enzima se inactivó por calor a 90 °C durante 10 minutos. El hidrolizado de colágeno se centrifugó (Heraeus Multifuge 3 L-R) a 3800 rpm y 4 °C durante 15 min y el sobrenadante se secó por atomización (Mini Spray Dryer B-290 Basic, Büchi, Flawil, Suiza) en las siguientes condiciones: 195 °C de temperatura interna, 17 % de poder de bomba, 65 % de poder de aspiración y 7,6 L/min de flujo. Finalmente, el polvo resultante (HC) se conservó a -20 °C hasta su uso.

Fracción peptídica <1 kDa de langostino (FP1)

Langostinos de la especie *Penaeus notialis*, fueron suministrados por la empresa Gambastar S.L. (Burgos, España) y almacenados a -20 °C. Son crustáceos sin valor comercial, ya que han estado almacenados por un tiempo excesivamente prolongado (alrededor de 6 años). Para su aprovechamiento se descongelaron y lavaron en agua fría. Las enzimas endógenas se inactivaron mediante calentamiento en baño de agua a 80 °C durante 20 minutos, previo empaquetamiento a vacío. Los langostinos se molieron en Osterizer y el homogenizado resultante se mezcló con buffer fosfato 0,07 M pH 8 (1:5, p/v) para ser sometido a hidrólisis enzimática con tripsina pancreática (7 unidades/mg), comprada en Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca), al 1 % (p/p) y parámetros controlados de 38 °C y pH 8 en pH-stato durante 90 minutos. Transcurrido este tiempo, la enzima se inactivó mediante calentamiento a 90 °C durante 20 minutos. El hidrolizado se centrifugó a 12000 g durante 20 min y seguidamente se filtró a través de membranas de 1 kDa obteniendo así una fracción peptídica <1 kDa (FP1), que se congeló a -80 °C, se liofilizó y finalmente se conservó a -20 °C hasta su uso. El grado de hidrólisis se determinó mediante el método de pH-stato descrito por Adler-Nissen (1986).

Extracto de grasa de crustáceo (GC)

Bioresiduos (cutícula, parápodos, pleópodos, cefalotórax y telson) del langostino *Litopenaeus vannamei*, proporcionados por la empresa Angulas Aguinaga Burgos (Burgos, España), se recolectaron y homogenizaron hasta un tamaño de partícula próximo a 5 mm. La extracción lipídica se desarrolló acorde al protocolo descrito por Gómez-Estaca et al. (2017). El homogeneizado se mezcló con acetato de etilo (1:5, p/v) y se mantuvo en agitación a 21 °C y condiciones de oscuridad durante 30 min. Seguidamente, el extracto se filtró por filtros Whatman No.1 y se rotaevaporó hasta eliminar el solvente. Finalmente, se conservó a -20 °C hasta su uso.

7.3. Elaboración de liposomas

La preparación de liposomas se llevó a cabo según el método descrito por Alemán et al. (2016), con algunas modificaciones. Inicialmente, el material encapsulante (lecitina o fosfatidilcolina semipurificada) fue disuelto en buffer fosfato 0,2 M pH 7,0 (1:4, p/v) y la mezcla incubada en baño de agua a 80 °C durante 1 h. En este paso cabe la posibilidad de incorporar un extracto bioactivo (diferente concentración según la formulación). Seguidamente, se añadió más buffer fosfato (1:4, p/v) y se volvió a mantener en baño a 80 °C 1 h. En este paso se añaden opcionalmente en la formulación diferentes compuestos, por ejemplo, un agente protector (1:0,6, p/v, es decir, 0,6 mL de crioprotector por cada 1 g de material encapsulante). La cantidad de crioprotector sustituye a la de buffer fosfato, siendo en este trabajo glicerol (Panreac) o trealosa (Cerestar) según el experimento, tal y como se detallará en el capítulo correspondiente.

Tras este segundo calentamiento, el volumen de la suspensión se completó con buffer fosfato (1:12, p/v) y las suspensiones se agitaron en vórtex a 60 °C para formar vesículas multilamelares. Finalmente, la muestra se sonicó con el objetivo de reducir el tamaño de las vesículas, así como el grado de lamelaridad. En la sonicación se empleó una sonda de diámetro 1/2" (12,7 mm) para un volumen constante de 20-50 mL. En la puesta a punto, las condiciones de sonicación establecidas fueron, por un lado, de 90 % de amplitud (120 W) durante 5 ciclos de 1 min cada uno, y por otro, de 20 % de amplitud (30 W) durante 2 ciclos de 1 min cada uno, con 1 min de parada entre ciclos. Estos minutos de parada, así como la presencia de hielo alrededor de la muestra, fueron necesarios para evitar que la temperatura de los liposomas excediese los 80 °C. Finalmente, se seleccionó la opción de sonicación de 90 % de amplitud y 5 ciclos. Las dispersiones liposomales se conservaron a 4 °C hasta su uso.

7.4. Estabilización de liposomas

Altas presiones

El tratamiento de alta presión (AP) se aplicó en un equipo de alta presión Stansted Fluid Power Iso-lab 900 (Modelo: FPG7100:9/2C, Stansted Fluid Power Ltd., Harlow, Essex, REINO UNIDO) bajo condiciones isostáticas de un solo ciclo de 600 MPa, 20 °C y 20 min.

Congelación-descongelación

El tratamiento de congelación-descongelación (CD) se aplicó mediante congelación a -20 °C durante 24 h y posterior descongelación a temperatura ambiente.

Liofilización

Los liposomas se congelaron a -80 °C durante 24 horas. Al día siguiente, se liofilizaron a presión reducida (100 mtorr). El liofilizado resultante se conservó a -20 °C hasta su uso.

Atomización

La atomización (A) se llevó a cabo a condiciones de temperatura interna de 170 °C, temperatura externa 89 °C, aspiración 70 %, bomba 20 % y flujo de aire 45 mm.

7.5. Aplicación de liposomas en matrices alimentarias

Reestructurados de merluza

El músculo de merluza (*Merluccius merluccius*), comprado en un mercado local, se homogenizó con sal (NaCl, 1 % p/p) en batidora (Braun, Madrid, España) durante 1 min. Seguidamente, los liposomas se añadieron en el músculo solubilizado (1:2, v/p) y posteriormente se homogeneizaron durante 2 min más. Como control se utilizó una formulación sin liposomas añadidos. Los homogeneizados de músculo se conservaron a 4 °C hasta su uso. Una porción de cada homogeneizado se congeló a -20 °C.

Los homogeneizados de músculo con liposomas se embutieron en tripas de celulosa de 35 mm, obtenidas en Viskase SA (Bagnold Cedex, Francia), y se sometieron a un proceso de gelificación de la proteína muscular mediante calentamiento (60 °C y 80 °C) en horno Rational (Combi-Master CM6) durante 45 min. Los reestructurados resultantes se enfriaron rápidamente en agua con hielo durante 5 min y se conservaron a 4 °C durante 12 horas.

Reestructurados de surimi de calamar

El surimi de calamar (*Dosidicus gigas*), adquirido en forma de bloques congelados en la industria (PSK Océanos S.A. Pozuelo de Alarcón, Madrid, España), se descongeló y se homogeneizó con sal (NaCl, 1 % p/p) en homogeneizador a vacío (FD112M10-72D, Stephan Machinery GmbH, Hameln, Alemania) durante 1 min. Seguidamente, los liposomas se añadieron en el surimi solubilizado (1:10, p/p) y posteriormente se homogeneizaron durante 2 min más. Como control se utilizó una formulación sin liposomas añadidos. Los homogeneizados con liposomas se embutieron en cilindros de acero inoxidable (3 cm x 3 cm) y posteriormente se sometieron a un proceso de gelificación de la proteína muscular mediante calentamiento (90 °C) en baño de agua durante 45 min. Los reestructurados resultantes, tras mantenerse durante 5 min en agua con hielo, se conservaron a 4 °C. Los geles de surimi también se conservaron a -20 °C durante 7 meses para evaluar su estabilidad en estado congelado.

Películas de caseinato sódico

El caseinato sódico (MGL Molkereigesellschaft Lauingen mbH, Alemania) se disolvió en agua desionizada (8 %) empleando un homogeneizador ultra-turrax (T 25 basic, IKA®-WERKE, Staufen, Alemania). Esta disolución se mezcló con las dispersiones liposomales mediante agitación magnética (1:0,6, v/v) y la solución resultante se sometió a 5 ciclos de sonicación de 1 min (con 1 min de parada entre ciclos). Las posibles burbujas presentes en la solución sonicada se eliminaron mediante un baño de ultrasonidos (Ultrasons, P-Selecta). Mezclando la disolución inicial (caseinato sódico en agua) con buffer fosfato pH 7 se elaboraron los controles. A continuación, cada dispersión (80 mL) se vertió en placas Petri rectangulares de 11,5 cm x 11,5 cm (10 placas por muestra) y se secaron en estufa (Binder, modelo FD 240, Tuttlingen, Alemania) a 45 °C durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, se acondicionaron a humedad relativa de 58 % a 22 °C durante 3 días antes de su utilización.

Películas de carboximetilcelulosa

La carboximetilcelulosa (Manuel Riesgo S.A., España) se disolvió en agua desionizada (4 %) empleando un homogeneizador ultra-turrax. Esta disolución se mezcló con las dispersiones liposomales mediante agitación magnética (1:1, v/v) y las burbujas se eliminaron a través de un baño de ultrasonidos. Mezclando la disolución inicial (carboximetilcelulosa en agua) con buffer fosfato pH 7 se elaboraron los controles. A continuación, cada dispersión (80 mL) se vertió en placas Petri rectangulares de 11,5 cm x 11,5 cm (10 placas por muestra) y se secaron en estufa a 45 °C durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, se acondicionaron a humedad relativa de 58 % a 22 °C, durante 3 días antes de su utilización.

7.6. Digestión gastrointestinal *in vitro*

Las muestras (extractos bioactivos, liposomas, geles y películas) se sometieron a una digestión gastrointestinal *in vitro*. Para ello, las muestras se homogeneizaron con agua desionizada y se ajustó el pH a 2 con HCl 6 N. Seguidamente, se añadió una disolución de pepsina (1:0,01, p/p) preparada en el momento en 1 mL de HCl 0,1 M y adquirida en Sigma Aldrich (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EEUU). Las soluciones se incubaron en baño de agua a 37 °C y agitación continua a 120 rpm/min durante 2 horas. A continuación se introdujeron en hielo durante 10 min para detener la 1ª etapa de digestión. Acto seguido se ajustó el pH a 6,5 con NaHCO₃ 1 M y se incorporó a las disoluciones una solución de pancreatina (1:0,0625 p/p, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EEUU) preparada en el momento en NaHCO₃ 1 M, y una solución de extracto de sales biliares (0,025 g/mL). Las muestras se incubaron nuevamente en baño de agua a 37 °C y agitación 120 vibraciones/min durante 2 horas. Igual que antes, se pusieron en hielo 10 min

para detener la digestión. El pH se ajustó a 7,2 con NaOH 0,5 M y finalmente las muestras se sometieron a centrifugación a 15000 rpm y 4 °C durante 30 minutos. El sobrenadante (fracción soluble o digerible) de extractos, liposomas y películas se recogió y conservó a 4 °C, siendo utilizado en el mismo día de su obtención, mientras que la fracción digerible de los geles se congeló y liofilizó para conservarse posteriormente a -20 °C hasta su uso.

Como control de la digestión de los geles se preparó una fracción acuosa con cada muestra, donde el gel se homogeneizó con agua desionizada (1:5, p/p). El pH se ajustó a 7,2 con NaOH 0,5 M y las muestras se centrifugaron en las mismas condiciones que los digeridos. Igualmente, el sobrenadante se liofilizó y conservó a -20 °C. Estas muestras constituyeron la fracción acuosa ya que no se añadieron las enzimas de la digestión ni se modificó drásticamente el pH de la disolución.

7.7. Caracterización de materias primas

Contenido en agua

El contenido en agua (%) se determinó, por triplicado, según el método 950.46 (AOAC, 2005). Las muestras se secaron en estufa a 105 °C hasta peso constante (aproximadamente 24 horas) y el contenido en agua se calculó por diferencia de pesos.

Contenido en cenizas

Las cenizas (%) se determinaron, por triplicado, según el método 900.02A (AOAC, 2005). Las muestras se incineraron a 500 °C durante 24 horas en una mufla (Select-Horn, P-SELECTA, EQ-056-CAM) y el contenido en cenizas se calculó por diferencia de pesos.

Contenido en proteína y aminoácidos

El perfil de aminoácidos y el contenido proteico se determinaron (por triplicado) acorde al método descrito por Alemán et al. (2013). Las muestras se diluyeron en agua MiliQ (1 mg/mL) y 50 µL de cada muestra se secaron e hidrolizaron a 110 °C durante 24 horas en presencia continua de HCl 6 N (0,1 % fenol) en ebullición. El estándar utilizado para la hidrólisis fue la norleucina, adquirido en Sigma Aldrich (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EEUU). Acto seguido, las muestras se secaron a vacío y se diluyeron en el buffer de aplicación del equipo. Finalmente, se inyectaron en un analizador de aminoácidos Biochrom 20 (Pharmacia, Barcelona, España) y se analizaron mediante cromatografía de intercambio iónico.

Contenido en grasa

El contenido lipídico crudo (% grasa) se determinó, por triplicado, según el procedimiento descrito por Bligh & Dyer (1959), con ligeras modificaciones. Las muestras se mezclaron con diclorometano (1:5,3, p/v) y metanol (1:10,6, p/v) con agitación continua durante 2 horas. Seguidamente, se volvió a añadir diclorometano (1:5,3, p/v) con agitación durante 20 minutos. A continuación se añadió agua desionizada (1:5,3, p/v) con agitación durante 20 minutos. La mezcla se dejó reposar a 4 °C durante 24 horas para permitir la separación de fases, momento en el que la fase superior se descartó. Por otro lado, la fase inferior se rotaevaporó a 60 °C bajo presión y posteriormente se secó en estufa a 105 °C durante 24 horas para eliminar los solventes. El contenido lipídico se calculó por diferencia de pesos, aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ grasa} = ((P_1 - P_2) / P_3) \times 100$$

Donde P_1 es el peso del matraz más la muestra tras el secado, P_2 es el peso del matraz vacío y P_3 es el peso de la muestra.

Fraccionamiento lipídico

Las muestras se disolvieron (0,133 mg/mL) en hexano y se inyectaron (500 μ L) en una columna SPE Bond Elut NH₂ 200 mg (Agilent Technologies), siguiendo el proceso descrito por Álvarez et al. (2009). El fraccionamiento se llevó a cabo para las tres fracciones lipídicas principales: una primera fase cloroformo-isopropanol para los lípidos neutros, una segunda fase dietileter-ácido acético (2 %) para ácidos grasos libres y una tercera fase metanol-HCl (2 %) para fosfolípidos. Los resultados, expresados en porcentaje, fueron la media de un duplicado.

Perfil de ácidos grasos

Las fracciones anteriores se secaron con nitrógeno y se derivatizaron para la obtención de ésteres metilados de ácidos grasos, acorde al procedimiento descrito por Gómez-Estaca et al. (2017). Estos ésteres metilados de ácidos grasos se inyectaron (1 μ L) en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector FID 260 ° (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU), con un flujo de H₂ de 40 mL/min y un flujo de aire de 450 mL/min. Se empleó una columna HP88 60 m x 0,25 mm x 0,2 μ m (Agilent). Las muestras se sometieron a cambios de temperatura desde 125 °C hasta 145 °C a razón de 8 °C/min, continuando hasta 220 °C a 2 °C/min y finalizando en 125 °C a 10 °C/min. Para su cuantificación se emplearon patrones internos de cada fracción (el triglicérido C13:0 para la fracción 1, el ácido graso libre C19:0 para la fracción 2, y el fosfolípido C15:0 para la fracción 3). El análisis de los datos se llevó a cabo con el software EZChrom Elite (Agilent Technologies), comparando los tiempos de retención. De esta forma, se obtuvo el perfil de ácidos grasos de cada fracción lipídica, expresando los resultados en mg/g de muestra. Se realizó un duplicado de cada muestra.

Identificación de fosfolípidos

La identificación de los fosfolípidos presentes en las muestras se desarrolló acorde al procedimiento descrito por Yan et al. (2010), con ligeras modificaciones. Las muestras se diluyeron (0,067 g/mL) en cloroformo y se secaron con nitrógeno, para su posterior resuspensión en metanol (1:1, v/v). Las muestras (dilución 1/200) se inyectaron (1 μ L) en un cromatógrafo de líquidos (Agilent 1200) acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent Accurate Mass, Agilent Technologies, Santa Clara, Ca, EEUU) de triple cuadrupolo (QqQ) G6410, empleando una columna Zorbax Eclipse XDB-C8 (Agilent Technologies) de dimensiones 4,6 mm x 150 mm x 5 μ m y una fuente de ionización a presión atmosférica (ESI). Como fase A se utilizó agua-formiato amónico 5 mM y como fase B metanol, a condiciones de 30 °C y 1 mL/min de flujo. Los resultados, expresados en términos de intensidad de señal y estudiados por duplicado, se analizaron mediante el software Masshunter Quantitative Analysis B.07.00 (Agilent Technologies).

El área del espectro de ionización de 85 posibles combinaciones, en función de los siete grupos de fosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina) y los cinco principales ácidos grasos encontrados previamente en este tipo de material (18:2n6c, C18:1n9c, C16:0, C18:3n3 y C18:0), se analizó teniendo en cuenta la masa teórica de la fórmula y la masa exacta determinada, tanto para iones de polaridad positiva como iones de polaridad negativa, identificándose finalmente 41 compuestos de fosfolípidos.

Cuantificación de tocoferol

Las muestras se sometieron a un proceso de saponificación con hidróxido potásico y posteriormente a un proceso de extracción con cloroformo. Este extracto se secó y resuspendió en metanol (1:2, v/v). Las muestras se inyectaron (2 μ L) en un cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (QqQ) G6410, acorde al método descrito por Gómez-Estaca et al. (2017). Se empleó una columna Supelcosil LC-F (4,6 mm x 150 mm x 5 μ m) con pre-columna, con una fase móvil de metanol a flujo isocrático de 0,6 mL/min y siempre en polaridad negativa. Los estándares α -tocoferol, δ -tocoferol y γ -tocoferol (Sigma Aldrich, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EEUU), se sometieron al mismo procedimiento que las muestras, registrándose en el rango 429,4-163,1 para α y γ -tocoferol (tiempos de retención de 5,61 y 5,44 min, respectivamente) y en 415,4-149,1 para el δ -tocoferol (tiempo de retención de 5,47 min). Se emplearon curvas de calibración de tocoferol a concentraciones de 0,04-2,50 μ g/mL para comparar con las áreas de las muestras. Para el análisis de los resultados, procedentes de la media de tres réplicas, se utilizó el software Masshunter Quantitative Analysis B.07.00 (Agilent Technologies).

Calorimetría Diferencial de Barrido

Las propiedades térmicas de las materias primas se estudiaron empleando un equipo de calorimetría diferencial de barrido (modelo TA-Q1000, TA Instruments, NewCastle, DE, EEUU), previamente calibrado mediante el uso de indio de alta pureza (temperatura de fusión 156,4 °C y entalpía de fusión 28,44 J/g). Las materias primas se resuspendieron en agua desionizada (250 mg/mL) y se encapsularon en cápsulas herméticas de aluminio. Una cápsula vacía se empleó como control. Las cápsulas se sometieron a un barrido de temperatura desde -35 °C hasta 90 °C a razón de 1 °C/min empleando nitrógeno seco como purgante. El software utilizado fue TA Instruments Universal Analysis 2000, mediante el cual se obtuvieron las temperaturas de los picos endotérmicos (pico de T, °C) y las entalpías de los cambios conformacionales (ΔH , J/g). Las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado.

Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier

La espectroscopía infrarroja de las materias primas se determinó empleando un espectrómetro infrarrojo (Perkin Elmer Spectrum 400, Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, EEUU) equipado con un accesorio de cristal ATR. La lecitina y fosfatidilcolina de 2 y 5 lavados desecadas, a temperatura ambiente, se colocaron a modo de fina capa sobre la superficie del prisma ATR y posteriormente se presionó con un émbolo de punta plana hasta que los espectros observados se mantuvieron estables. Los espectros se estudiaron con el software Spectrum versión 6.3.2. (Perkin Elmer Inc.). La resolución espectral fue de 4 cm^{-1} , el intervalo estudiado osciló entre 4000 y 650 cm^{-1} , y los resultados procedieron de la media de 32 repeticiones por espectro, realizando un triplicado de espectros por muestra.

7.8. Caracterización de extractos bioactivos

Contenido en agua

El contenido en agua de los extractos bioactivos se determinó acorde al método 950.46 A.O.A.C. previamente descrito.

Contenido en proteína y aminoácidos

El contenido en proteína y perfil de aminoácidos de los extractos bioactivos se determinó del mismo modo que se hizo con las materias primas.

Identificación de los principales componentes activos

Mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución en un cromatógrafo Shimadzu (SPE-MA10AVP, Kyoto, Japón) se determinaron y cuantificaron los principales compuestos activos de los extractos peptídicos y polifenólicos.

La distribución de pesos moleculares de los extractos peptídicos de HC y FP1 se determinó mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC-HPLC), tal y como describe Alemán et al. (2011a), empleando una columna de péptidos Superdex PC 3.2/30 (GE Healthcare Bio-Sciences, Barcelona, España).

La identificación de los principales compuestos fenólicos de los extractos PG y HM se llevó a cabo acorde al procedimiento de Giménez et al. (2013). Los extractos se analizaron mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (RP-HPLC) empleando una columna analítica C18 (Tracer Excel 120 ODS-A 5 µm 25 x 0,46, Teknokroma, Barcelona, España). Las muestras se eluyeron en un sistema de gradientes con un solvente A (agua MiliQ) y un solvente B (metanol:acetonitrilo, 60:40), ambos conteniendo ácido acético al 1 %, con un flujo de 0,6 mL/min. La temperatura de la columna se mantuvo constante a 25 °C, y el volumen de inyección fue de 20 µL. El sistema de gradientes fue: 10 % de B durante 10 min, 10 – 60 % de B en 60 min, 60 – 10 % B en 10 min, 10 % de B durante 10 min. Los compuestos fenólicos se monitorizaron a 253 nm y 368 nm. Su identificación y posterior cuantificación se llevó a cabo mediante curvas de calibración de estándares puros. Los análisis se llevaron a cabo al menos por duplicado.

En cuanto al extracto de grasa de crustáceo (GC), sus diversos componentes se determinaron mediante distintas técnicas, acorde a Gómez-Estaca et al. (2017): el perfil de ácidos grasos mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama (FID) empleando una columna HP-88; el contenido en vitamina E (tocoferol) y colesterol mediante cromatografía de líquidos equipada con una columna Supelcosil LC-F y acoplada a un espectrómetro de masas de simple cuadrupolo; y el contenido en carotenoides (astaxantina) a través de dos métodos, por Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa acoplada a espectrometría de masas (RP-HPLC-MS) y por Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa acoplada a detector de diodos (RP-HPLC-DAD) empleando una columna Develosil UG C30.

Los patrones usados para las diversas determinaciones fueron: epigallocatequina, epicatequina-3-galato, epigallocatequina-galato, catequina, rutina, hiperósido y kaempferol-3-O-glucósido de Extrasynthese (Genay, Cedex, Francia); mientras que los patrones quercetina, ácido gálico, ácido elágico, ácido cafeico, ácido rosmarínico, punicalagina, ácido clorogénico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido siríngico, vitamina C, vitamina B12, aprotinina, ácido hipúrico fueron de Sigma Aldrich (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EEUU).

Citotoxicidad

Se evaluó el posible efecto citotóxico, en células Caco-2, de los extractos bioactivos (PG y HM), así como de los liposomas encapsulando dichos extractos. El medio de cultivo utilizado para crecer las células fue el MEM (Minimum Essential Medium) suplementado con suero bovino fetal 10 %, ambos comprados en Thermo Fisher Scientific (Asheville, NC, EEUU). Para evaluar la viabilidad celular, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 5000 células/pocillo y se incubaron durante 24 h a 37 °C y 5 % de CO₂. Transcurrido este tiempo, fueron tratadas con diferentes concentraciones de bioactivos e incubadas nuevamente durante 24 h. La viabilidad celular se determinó empleando el Kit CCK-8 (Dojindo Cell Counting Kit-8, Dojindo, Rockville, MD), siguiendo el protocolo del fabricante. Los resultados se expresaron

como porcentaje de viabilidad celular con respecto a un control de células sin tratar. Los resultados fueron la media de al menos cuatro réplicas.

7.9. Caracterización de liposomas

Características de partícula: tamaño, polidispersidad y potencial Z

El tamaño medio de partícula (expresado como % de intensidad y nm, conocido como z-average), el índice de polidispersidad y el potencial zeta (expresado como mV) se cuantificaron por dispersión dinámica de luz usando un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Reino Unido). Las dispersiones liposomales se midieron a 25 °C tras una dilución 1/10 en agua desionizada mientras que los liposomas liofilizados primero se resuspendieron en agua desionizada (77 mg/mL) y posteriormente se analizaron del mismo modo que las dispersiones, acorde a Alemán et al. (2016). El índice de refracción de cada muestra liposomal resuspendida fue determinado en función de los grados Brix mediante la utilización de un refractómetro (modelo 50301020, ZUZI, I.C.T., S.L., La Rioja, España) e introducido como parámetro en el software del equipo. Las muestras se midieron por triplicado. Los resultados fueron analizados mediante un software específico de Malvern Zetasizer PSS0012-38 v7.12.

Contenido en agua

El contenido en agua de los liposomas se determinó acorde al método 950.46 A.O.A.C. previamente descrito.

Dispersabilidad en agua

Los liposomas se diluyeron en agua desionizada (1 %, p/v) a 20 °C bajo agitación a 100 rpm durante 150 min, posteriormente se centrifugaron a 3500 rpm a 4 °C durante 5 min. El sobrenadante resultante se secó en estufa a 105 °C durante 24 h y la dispersabilidad en agua, expresada como porcentaje, se calculó por diferencia de pesos, aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Dispersabilidad en agua} = ((P_1 - P_2) / P_3) \times 100$$

Donde P_1 es el peso de la cápsula más la muestra tras el secado, P_2 es el peso de la cápsula vacía y P_3 es el peso de la muestra.

En el cálculo se tuvo en cuenta el contenido en agua de cada muestra, empleando como P_3 el peso seco de la muestra. La dispersabilidad se determinó por triplicado.

Eficacia de encapsulación

La eficacia de encapsulación de los diferentes liposomas se determinó, por triplicado, mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ encapsulación} = (\text{cantidad de extracto encapsulado} / \text{cantidad extracto total}) \times 100$$

La cantidad de extracto encapsulado se calculó mediante la diferencia entre la cantidad de extracto total y la parte no encapsulada.

La cantidad de extracto no encapsulado se determinó de la siguiente manera en función del extracto:

Los liposomas con hidrolizados peptídicos (120 mg/mL) se homogenizaron con acetona, los liposomas con extractos polifenólicos (PG) se mezclaron (120 mg/mL) con una solución de etanol/metanol (1:1, v/v), y los liposomas con extractos lipídicos se disolvieron en hexano

(80 mg/mL). Las tres mezclas se agitaron en vórtex durante 2 minutos y seguidamente se centrifugaron a 5000 g y 4 °C durante 30 min. El sobrenadante se filtró por filtros de membrana de 0,45 µm (Multiflo 15/0, 45 NYL), comprados en OSGONSA (Madrid, España), y se analizó por diferentes métodos. En los liposomas con el extracto polifenólico de hinojo marino (HM), en cambio, la parte no encapsulada se separó de los liposomas utilizando filtros de membrana Amicon Ultra-15 con un peso molecular de corte de 10 kDa (10000 MWCO, Millipore Corp.) y centrifugando a 4000 g por 30 min. Por otro lado, los liposomas se mezclaron (1:1) con Tritón X-100 (20 %, v/v) y se agitaron en vórtex hasta su completa homogeneización para cuantificar la cantidad de extracto total.

Las muestras de hidrolizados se secaron en estufa a 60 °C y su contenido en proteína se determinó por un analizador de nitrógeno/proteína (LECO FP 2000, Corp., St. Joseph, MI, USA). De las muestras con extractos polifenólicos se analizó el contenido de sustancias reactivas al Folin-Ciocalteu, acorde a Slinkard & Singleton (1977). De las muestras con extractos lipídicos se determinó su absorbancia a 470 nm y la cantidad de astaxantina se calculó mediante la siguiente fórmula, como describió Gómez-Estaca et al. (2016):

$$\text{Astaxantina (mg)} = A \times V \times 597 / \epsilon$$

Donde A es la absorbancia obtenida a 470 nm, V es el volumen de dilución (mL), 597 es el peso molecular de la astaxantina y ϵ es el coeficiente de absorción molar (125,100 para la astaxantina en hexano).

Microscopía electrónica de transmisión convencional

Inicialmente, 100 µL de dispersión liposomal se diluyeron en 10 mL de agua desionizada. Seguidamente, la fijación de la muestra se llevó a cabo depositando una gota de esta nueva solución sobre parafilm y posteriormente una rejilla de cobre recubierta de grafito sobre ella, manteniéndola así durante 5 min. Finalmente, la muestra liposomal fijada se tiñó mediante una solución de acetato de uranilo al 2 % durante 20 segundos, y se procedió a la observación mediante un microscopio JEOL JEM -1010 (JEOL, Tokyo, Japón) operando a 80 kV.

Microscopía electrónica de transmisión a temperatura criogénica

Los liposomas (3 µL para dispersiones liposomales y 30 mg/mL para liposomas liofilizados) se cargaron en rejillas agujereadas de carbono Quantifoil R2/2 (Quantifoil Micro Tools GmbH, Groblöbichau, Alemania), previamente sometidas a una descarga luminiscente de ionización. El método empleado fue la vitrificación de las muestras utilizando un sistema de preparación de cryo-muestras Gatan (Gatan Inc., Pleasanton, CA, EEUU), etanol líquido y un tiempo de transferencia de 8-10 segundos. La observación de la muestras se llevó a cabo en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1230 (Jeol Ltd., Akishima, Japón) operando a 100 kV y con un aumento de 30 K, empleando un porta cryo-muestras Gatan 626. Las micrografías se recogieron, a una temperatura de -180 °C, con un detector de cámara TVIPS CMOS 4k x 4k (TemCam-F416).

Colorimetría

El color de las preparaciones liposomales se analizó mediante un colorímetro (CM-3500d, Konica Minolta, Madrid, España), empleando una placa de calibración blanca CM-A90 y una placa de calibración cero CM-A124. Las condiciones utilizadas para la medición fueron de iluminante D65 y como observador estándar D10. Se cuantificaron los parámetros del espacio color tridimensional CIELab, así como los correspondientes valores de cromaticidad y tonalidad para las distintas muestras. L* indica la luminosidad oscilando entre L*=0 (negro) y L*=100 (blanco),

a^* indica el intervalo entre rojo ($a^* > 0$) y verde ($a^* < 0$), b^* indica el intervalo entre amarillo ($b^* > 0$) y azul ($b^* < 0$). El valor de cromaticidad refleja la saturación del color y el de tonalidad el tono de color, cuyos valores se obtienen a partir de los del espacio color Lab:

$$\text{Cromaticidad} = ((a^*)^2 + (b^*)^2)^{1/2}$$

$$\text{Tonalidad} = \arctg((b^*) / (a^*))$$

Los resultados obtenidos fueron la media de al menos 10 réplicas.

Reología dinámica oscilatoria

Las propiedades viscoelásticas de las preparaciones liposomales liofilizadas se determinaron en un reómetro (Bohlin Instruments Ltd., modelo CVO-100, Worcestershire, Reino Unido) empleando como geometría un cono-plato (ángulo del cono 4 ° y distancia 0,15 mm). Los parámetros reológicos de módulo elástico (G' , Pa), módulo viscoso (G'' , Pa) y ángulo de fase (δ , °) se representaron en función de un barrido de temperatura desde 15 °C hasta 80 °C a razón de 1 °C/min con una frecuencia continua de 1 Hz, y en función de un barrido de frecuencias desde 0,1 hasta 10 Hz con una amplitud de oscilación del 5 % y con una temperatura continua de 10 °C. Además, se caracterizó la dependencia de frecuencia de G' mediante la ley de la potencia aplicando la siguiente fórmula:

$$G' = G_0' \omega^{n'}$$

Donde G_0' es la energía por ciclo a frecuencia 1 Hz, ω es la frecuencia y n' es el exponente de la ley de la potencia. Este valor de n' nos indica el comportamiento de nuestra muestra, donde un valor cercano a 0 indicaría un comportamiento elástico ideal. Al menos dos determinaciones se llevaron a cabo por muestra. El error experimental fue menor del 6 % en todos los casos.

Calorimetría Diferencial de Barrido

Las propiedades térmicas de los liposomas se estudiaron en un equipo de calorimetría diferencial de barrido del mismo modo que se hizo con las materias primas. Los liposomas en estado líquido se concentraron en Speed Vac (SPD131DDA, Thermo Fisher Scientific, Asheville, NC, EEUU) acoplado a una trampa de vapor de refrigeración (RVT4140-230, Thermo Fisher Scientific, Asheville, NC, EEUU) y a una bomba de vacío (OFP 400, Thermo Fisher Scientific, Asheville, NC, EEUU) hasta una concentración de 250 mg/mL y después se encapsularon en cápsulas herméticas de aluminio mientras que los liposomas liofilizados se encapsularon directamente o tras ser resuspendidos en agua desionizada (250 mg/mL). Una cápsula vacía se empleó como control. Las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado.

Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier

La espectroscopía infrarroja de las preparaciones liposomales secas se determinó en un espectrómetro infrarrojo del mismo modo que se hizo con las materias primas. Los resultados procedieron de la media de 32 repeticiones por espectro, realizando un triplicado de espectros por muestra.

Estabilidad oxidativa o enranciamiento por el método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

Los liposomas fueron mezclados (1:3, p/v) con ácido tricloroacético (7,5 %) y centrifugados a 5100 g y 4 °C durante 5 min. El sobrenadante fue mezclado entonces (1:2, p/v) con ácido tiobarbitúrico 0,02 M y mantenido a 20 °C en oscuridad durante 15 h (agua desionizada fue

usada como control). Finalmente, la absorbancia de las muestras fue medida a 532 nm en un espectrofotómetro (UV-1601, modelo CPS-240, Shimadzu, Kyoto, Japón). Una curva de calibración basada en 1,1,3,3-tetraetoxipropano fue elaborada a concentraciones que oscilan entre 0,0005 y 0,0025 mg/L, expresando los resultados como µg de equivalentes de malonaldehído por kg de muestra en base seca. Los resultados fueron la media de 3 réplicas.

Absorción intestinal

Los estudios de absorción intestinal *in vitro* se llevaron a cabo utilizando una línea de células Caco-2, como modelo celular del epitelio intestinal humano. Las células Caco-2 fueron suministradas por el banco de células del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC). Las células se mantuvieron en un incubador a 37 °C y 5 % de CO₂, en frascos de 75 cm², utilizando como medio de cultivo MEM Alpha enriquecido con 10 % de Suero Fetal Bovino, y conteniendo 1 % de antibióticos (penicilina y estreptomycin). Todos los reactivos fueron comprados en Thermo Fisher Scientific (Asheville, NC, EEUU). Para la formación de la monocapa celular, las células se sembraron a una densidad de 3 x 10⁴ células/cm², en soportes bicamerales de 24 pocillos (Transwell Inserts Costar) con 6,4 mm de diámetro, 0,3 cm² de superficie y 0,4 µm de poro de membrana. Se adicionó medio de cultivo tanto en el compartimento apical (con células) como en el basolateral (sólo medio de cultivo). Las placas se mantuvieron en el incubador hasta la formación de la monocapa (21 días), cambiando el medio de cultivo cada 2-3 días. El seguimiento e integridad de la formación de la monocapa celular se llevó a cabo mediante la medida de la resistencia eléctrica (TEER) utilizando un equipo Milicell-ERS (Millipore, Watford, Reino Unido).

Una vez formada la monocapa celular, se lavaron las células con HBSS (Hanks Balance Salt Solution, pH 7,4) y se sustituyó el medio de cultivo por dicho buffer, tanto en el compartimento basolateral como en el apical. A continuación, se añadieron los compuestos a analizar (extracto de hinojo y dispersión liposomal encapsulando dicho extracto) en el compartimento apical, y se volvieron a incubar las placas a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 1 hora y 3 horas. Posteriormente, se recogieron las muestras de ambos compartimentos y se almacenaron a -20 °C para su posterior análisis por RP-HPLC, siguiendo las mismas condiciones descritas previamente para la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos.

7.10. Caracterización de homogeneizados y geles de músculo

Contenido en agua

El contenido en agua de los homogeneizados se determinó acorde al método 950.46 descrito previamente.

Capacidad de retención de agua

Se pesó una porción de homogenizado previamente congelado y se le adicionó un filtro absorbente de peso conocido (filtro de pipeta Gilson). Una vez descongelado se centrifugó a 4000 g y 20 °C durante 15 min y posteriormente se pesó nuevamente el filtro. La capacidad de retención de agua se calculó, por triplicado, por diferencia de pesos, aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ capacidad de retención de agua} = (1 - ((P_1 - P_2) / P_3) / \% \text{ contenido en agua}) \times 100$$

Donde P₁ es el peso del filtro tras la centrifugación, P₂ es el peso del filtro seco inicial y P₃ es el peso de la muestra inicial. En el cálculo se tuvo en cuenta el contenido en agua de cada muestra.

Solubilidad proteica

Los homogeneizados se mezclaron (1:10, p/v) con una solución de cloruro sódico (5 %, p/v) en un homogeneizador Omni-Mixer (modelo 17106, Omni Intl., Waterbury, Conn., EEUU) a potencia 6 durante 1 min. Entonces las mezclas se agitaron a 4 °C durante 30 min y se centrifugaron a 6000 g y 2 °C durante 30 min. El sobrenadante obtenido (proteína soluble) se analizó mediante un analizador de nitrógeno/proteína (LECO), usando un factor de conversión de Nitrógeno para la proteína de 6,25. El contenido de proteína soluble se expresó en porcentaje como la proteína soluble respecto al contenido proteico total de la muestra. Se llevó a cabo un triplicado por muestra.

Perfil electroforético por SDS-PAGE

El perfil electroforético de la fracción soluble de los homogeneizados se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) acorde a Laemmli (1970), con algunas modificaciones. Las muestras se mezclaron (1:1, v/v) con el buffer desnaturalizante (Tris-HCl 50mM pH 6,8, 10 % de β -mercaptoetanol, ácido etilendiaminotetraacético 2 mM, 0,1 % de azul de bromofenol, 5 % de dodecilsulfato sódico y 30 % de glicerol) y se calentaron en baño de agua a 90 °C durante 5 min. La concentración final de proteína fue de 2-3 mg/mL. Seguidamente, 15 μ L de cada muestra se cargaron en el gel (10 % Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 12-weel, 20 μ L), así como 10 μ L del estándar de pesos moleculares (Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards), obtenidos ambos en Bio-Rad (Madrid, España). El gel se colocó en un porta-geles conteniendo un buffer *reservoir* (Tris-HCl 0,25 mM, glicina 1,92 M y 1 % de dodecilsulfato sódico, pH 8,3) y acoplado a dos electrodos cuya corriente eléctrica permitió la separación de las proteínas hasta el final del gel en función de sus pesos moleculares. Transcurrido este paso, los geles se tiñeron con una solución de tinción (0,1 % de azul de Coomassie, 50 % de metanol y 10 % de ácido acético) mediante agitación durante 1 h. Seguidamente se destiñeron con una solución de desteñido (30 % de metanol y 10 % de ácido acético), con agitación leve. Finalmente, el gel se conservó en una solución conservante (5 % glicerol y 10 % ácido acético) y se obtuvo una imagen del gel mediante un analizador de imagen (Gel-Doc, BIO-RAD).

Caracterización de agregados: tamaño medio, polidispersidad y potencial zeta

Las propiedades de los agregados proteicos de la fracción soluble de los homogeneizados se analizaron mediante dispersión dinámica de luz en un Zetasizer del mismo modo que se hizo para los liposomas, sometiendo dicha fracción soluble a una dilución 1/100 y vertiéndola directamente en la cubeta. Los resultados son la media de al menos tres determinaciones.

Resonancia Magnética Nuclear de Protón de Bajo Campo

Los homogeneizados se sometieron a un estudio de distribución de tiempos de relajación de protón por relaxometría T₂, desarrollada siguiendo el método descrito por Sánchez-Alonso et al. (2012). Las muestras se cortaron en paralelepípedos de 1 x 1 x 2 cm (aproximadamente 2 g) en estado congelado y se introdujeron en tubos específicos para la técnica (1,8 cm de diámetro y 18 cm de altura). Las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta su casi completa descongelación, sin llegar a la pérdida de agua o exudado. En este momento se llevó a cabo la determinación de las muestras utilizando un equipo de Resonancia Magnética Nuclear de Bajo Campo (Minispec mq20, Bruker Optik GmbH, Alemania) con una fuerza de campo magnético de 0,47 T y 20 MHz. Este equipo se acopló a un baño de refrigeración y recirculación (C/DC clase DC10-K10, Thermo Haake®, Fisher Scientific S.L., Madrid, España) estabilizado a 4 °C. Los tiempos de relajación T₂ se analizaron empleando la secuencia de impulsos Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) con un

valor de T de 150 μ s y 16 escaneos en un intervalo de 2 segundos con un total de 3000 repeticiones por muestra. Los análisis se llevaron a cabo por distribución de los tiempos de relajación mediante relaxometría T2 (CONTIN). Los resultados obtenidos, expresados en términos de amplitud de la señal (%) y tiempo de relajación (ms), fueron la media de 4 réplicas por muestra.

Calorimetría Diferencial de Barrido

Las propiedades térmicas de los homogeneizados se analizaron en un equipo de calorimetría diferencial de barrido del mismo modo que para los liposomas, encapsulando los homogeneizados directamente en las cápsulas herméticas de aluminio.

Reología dinámica oscilatoria

Las propiedades estructurales y gelificantes de los homogeneizados frente a cambios de frecuencia y de temperatura se determinaron mediante reología dinámica oscilatoria siguiendo el mismo procedimiento que para los liposomas.

Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de los geles se analizaron mediante un texturómetro TA-XT Plus (Texture Technologies Corp., Scarsdale, NY, EEUU) con un émbolo cilíndrico de acero inoxidable de 5 mm de diámetro acoplado a una célula de carga de 5 kg. El método empleado fue el de penetración sobre la muestra (35 mm de diámetro aproximadamente), con un parámetro de velocidad del émbolo de 1,0 mm/s (para los geles de surimi) y de 0,33 mm/s (para los geles de merluza). Los parámetros estudiados fueron la fuerza de rotura (N) y la deformación hasta rotura (mm), así como la resistencia del gel (N x mm), obtenida del producto de la fuerza y la deformación hasta rotura. Los resultados obtenidos fueron la media de al menos 3 réplicas.

Colorimetría

El color de los geles se determinó mediante un colorímetro del mismo modo que se hizo para los liposomas.

Estabilidad oxidativa o enranciamiento por el método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

La estabilidad oxidativa o rancidez de los geles se cuantificó siguiendo el mismo procedimiento que se llevó a cabo para los liposomas.

7.11. Caracterización de películas

Caracterización de partículas: tamaño medio, polidispersidad y potencial zeta

Las características de los liposomas contenidos en las películas se analizaron mediante dispersión dinámica de luz en Zetasizer del mismo modo que para los liposomas, utilizando una concentración de película de 5 mg/mL y posterior dilución 1/10.

Microscopía electrónica de transmisión convencional

Las películas de caseinato sódico se fijaron en una solución de buffer fosfato 0,1 M pH 7 conteniendo 2,5 % de glutaraldehído y 4 % de paraformaldehído durante 2 h. Tras este tiempo, se lavaron con agua desionizada y se post-fijaron con tetraóxido de osmio al 1 %. A continuación,

las muestras se deshidrataron con acetona, se embebieron en una resina Epon 812 y se secaron a 200 °C. Finalmente, se cortaron en secciones ultrafinas con un ultramicrotomo (LKB Bromma 2088, Suiza) y se tiñeron con acetato de uranilo al 2 %.

Microscopía electrónica de transmisión a temperatura criogénica

Las imágenes de las películas de carboximetilcelulosa se obtuvieron del mismo modo que para los liposomas, utilizando una concentración de 10-20 mg/mL.

Contenido en agua

El contenido en agua de las películas se determinó acorde al método 950.46 A.O.A.C. previamente descrito.

Solubilidad

La técnica se desarrolló acorde a Alemán et al. (2016), con ligeras modificaciones. Trozos de película de dimensiones conocidas (2 x 2 cm) se colocaron en recipientes con 15 mL de agua desionizada, los cuales se mantuvieron a 22 °C y sin agitación durante 15 h. Transcurrido el tiempo, la solución resultante se filtró a través de filtros Whatman No.1 para recuperar la película sin disolver, que se desecó en estufa a 105 °C durante 24 h. La solubilidad de la película (%) se calculó mediante la expresión:

$$[(Po-Pf) / Po] \times 100,$$

Donde, *Po* es el peso inicial de la película expresada como materia seca y *Pf* es el peso del residuo desecado sin disolver de la película. El análisis se realizó al menos por triplicado.

Colorimetría

El color de las películas se determinó mediante un colorímetro del mismo modo que se hizo para los liposomas.

Espesor

El espesor de las películas se determinó acorde al método descrito por Alemán et al. (2016), empleando un micrómetro (MDC- 25M, Mitutoyo, Kanagawa, Japón) con el que se realizaron diversas mediciones aleatorias para cada película en diferentes zonas de éstas. Los resultados, expresados en micrómetros (µm), fueron la media de 10 medidas.

Transparencia

La transparencia de las películas se determinó según el método de Alemán et al. (2016). Pequeños trozos de película de dimensiones conocidas (7-8 cm de longitud y 1 cm de anchura) se colocaron en cubetas de cuarzo y se sometieron a un barrido de absorbancias en un rango desde 190 hasta 800 nm. El índice de opacidad se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$O = A / x,$$

Donde, *O* es el índice de opacidad, *A* la absorbancia a 600 nm y *x* el espesor (expresado en milímetros). Los resultados fueron la media de un triplicado.

Test de tracción

El test de fuerza de tracción de las películas se llevó cabo en un texturómetro TA.XT plus TA-XT2 acorde al método descrito por Blanco-Pascual et al. (2013). Las muestras se cortaron en rectángulos (100 mm x 20 mm) y se engancharon en el apéndice del brazo del texturómetro por la zona estrecha, dejando una separación de 60 mm (l_0) en ambos extremos. Se empleó una célula de carga de 5 kg y una velocidad de estiramiento de 100 mm/min. La fuerza de tensión (MPa) y la elongación en la rotura $[(l_{rotura} - l_0)/l_0] \times 100, (\%)$, se determinaron mediante curvas de estrés/tensión en el punto de rotura. Las determinaciones se realizaron al menos cinco veces.

Test de adherencia

Esta técnica, llevada a cabo en un texturómetro TA.XT plus TA-XT2, se basa en la fuerza máxima necesaria (N) para despegar la película (11,5 cm x 11,5 cm) de la superficie plana de un cilindro metálico (20 mm de diámetro) acoplado al brazo del texturómetro. El brazo del equipo se bajó a una velocidad de 0,2 mm/s hasta que el cilindro estuvo en completo contacto con la película. Entonces el brazo se subió a una velocidad de 2 mm/s hasta que la película se separó completamente del cilindro. Para estandarizar la medida, una precarga de 500 mN se aplicó durante 15 segundos. Se realizaron al menos 8 réplicas por película.

Test de mucoadhesividad

Esta técnica se llevó a cabo según el método descrito por Ivarsson & Wahlgren (2012). Este método tiene el mismo fundamento que el test anterior (adherencia), con la diferencia de que en este caso la superficie plana del cilindro que entrará en contacto con la película se unta con una solución de mucina comercial (20 %, p/v), obtenida en Sigma Aldrich (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EEUU), y se registra la fuerza máxima necesaria (N) para despegar la película de la capa de mucina adherida al cilindro.

Análisis sensorial

La evaluación sensorial de las películas la llevó a cabo con un panel de 12 evaluadores expertos y entrenados en este tipo de películas comestibles. Las películas fueron cortadas en tiras de 5 cm x 2 cm, que se introdujeron en la boca hasta su completa disolución, sin masticarlas ni tragarlas. Los parámetros estudiados y su ponderación por parte de los jueces entrenados fueron los siguientes: salivación (0=salivación nula; 10=salivación excesiva), adherencia (0=adherencia nula; 10=adherencia excesiva), aroma (0=aromas extraños o desagradables; 10=aromas muy agradables) y tiempo de disolución (tiempo corto=0-40 segundos; tiempo medio=30-80 segundos; tiempo excesivo=más de 80 segundos). Los resultados fueron la media de 12 medidas (12 jueces).

7.12. Caracterización de los productos de la digestión gastrointestinal *in vitro*

Características de partícula: tamaño medio, polidispersidad y potencial zeta

Las propiedades de partícula de las fracciones solubles recolectadas de la digestión gastrointestinal *in vitro* de liposomas y películas con liposomas se estudiaron mediante dispersión dinámica de luz en Zetasizer del mismo modo que las muestras anteriores, vertiendo directamente las fracciones solubles en las cubetas.

Microscopía electrónica de transmisión a temperatura criogénica

Las imágenes por microscopía electrónica de transmisión mediante criofijación de las fracciones solubles recolectadas de la digestión gastrointestinal *in vitro* de liposomas y películas con liposomas se obtuvieron siguiendo el procedimiento descrito previamente.

7.13. Actividades biológicas

Capacidad de secuestro de radicales libres mediante foto-quimio-luminiscencia

Las muestras fueron diluidas en metanol puro (40 mg/mL) y analizadas mediante un Photochem (Analytikjena AG, Jena, Alemania), únicamente por la vía de compuestos lipofílicos. Los resultados fueron expresados como mg de equivalentes de Trolox por g de muestra en base seca, basándose en una curva de calibración empleando Trolox como estándar. Los resultados fueron la media de tres ensayos.

Capacidad de secuestro de radicales libres (ABTS)

Esta determinación se llevó a cabo acorde al método descrito por Alemán et al. (2011a). Las muestras se mezclaron con el radical ABTS⁺ (1:50, v/v), generado previamente a partir del reactivo ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico) 7 mM y K₂S₂O₈ 2,45 mM en agua desionizada, y se incubaron en baño de agua a 30 °C y oscuridad durante 10 min. Finalmente se leyó la absorbancia del radical a 734 nm en un espectrofotómetro. Los resultados se expresaron como mg de ácido ascórbico equivalentes por cada g de muestra. Las muestras fueron analizadas por triplicado.

Capacidad de reducción del hierro (FRAP)

Esta técnica se desarrolló según el método descrito por Alemán et al. (2011a). Las muestras se mezclaron con el reactivo FRAP (1:30, v/v), previamente obtenido a partir de buffer acetato sódico 0,1 M pH 3,6 (25 mL), una solución de 2,4,6-tripiridil-s-triazina 10 mM disuelto en HCl 40 mM (2,5 mL) y una solución de cloruro de hierro 20 mM (2,5 mL), y se incubaron en baño de agua a 37 °C y oscuridad durante 30 min. Finalmente, la absorbancia fue medida en un espectrofotómetro a 595 nm. Los resultados fueron expresados como μ moles de Fe²⁺ equivalentes por gramo de muestra, en base a una curva de calibración de FeSO₄. Tres réplicas fueron llevadas a cabo por cada muestra.

Contenido de sustancias reactivas al Folin-Ciocalteu

Las muestras fueron disueltas en agua desionizada (1:75, v/v), reactivo de Folin (1:5, v/v) y NaCO₃ (1:15, v/v), e incubadas a temperatura ambiente y oscuridad durante 2 h. Tras ello, se midió su absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro. Los resultados se expresan como mg de ácido gálico equivalentes por gramo de muestra. Las muestras fueron medidas por triplicado.

Actividad antihipertensiva

La actividad antihipertensiva se determinó mediante la capacidad de las muestras para inhibir la enzima convertidora de la angiotensina (ACE). Las muestras (20 μ L) se mezclaron con 50 μ L del sustrato hipuril-histidil-L-leucina (HHL) 2,5 mM, disuelto en buffer fosfato potásico 0,1 M pH 8,3, y 100 μ L de la enzima ACE (EC 3.4.15.1, 0,025 U/mL), ambos reactivos comprados en Sigma Aldrich (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EEUU). La reacción se incubó a 37 °C con agitación a 160 rpm/min durante 2 horas. La enzima se inactivó con HCl 1 M. El HHL y el ácido

hipúrico formado tras la reacción, en presencia o no de las muestras, se cuantificaron por RP-HPLC utilizando una columna analítica C18 (Tracer Excel 120 ODS-A 5 μ m 25 x 0,46, Teknokroma, España) y siguiendo el método descrito por Alemán et al. (2011a). Las muestras se eluyeron a un flujo de 0,8 mL/min, en un sistema de gradientes con agua MiliQ como solvente A y acetonitrilo como solvente B (20-60 % de B en 26 min), ambos conteniendo ácido trifluoroacético al 0,1 %. La temperatura de la columna se mantuvo constante a 25 °C, y el volumen de inyección fue de 50 μ L. Los resultados, que fueron la media de al menos 3 ensayos, se expresaron como porcentaje de inhibición a una concentración determinada, o como valores de IC₅₀ (concentración necesaria para inhibir la actividad de la enzima ACE en un 50 %).

Actividad hipoglucémica

La actividad inhibitoria de la enzima dipeptidil peptidasa IV fue cuantificada acorde al método descrito por Tulipano et al. (2011). Las muestras fueron mezcladas con la enzima en una placa de 96 pocillos. Tras la adición del sustrato cromogénico (H-Gly-Pro-AMC·HBr), la mezcla (concentración final de 25 μ M) fue incubada a 37 °C durante 15 min. Finalmente, se midió la fluorescencia a 355 y 460 nm en un lector de placas Appliskan Multimode (Thermo Fisher Scientific, MA, EEUU) cada 2 min durante un periodo de 30 min, expresando los resultados como porcentaje de inhibición en función del tiempo transcurrido. La regresión logarítmica fue utilizada para calcular el IC₅₀ o valor de concentración de muestra necesaria para inhibir el 50 % de la actividad de la enzima. Los resultados fueron la media de al menos un duplicado.

7.14. Análisis estadístico

Los análisis de varianza (ANOVA) de una o varias vías (para comparar entre tres o más muestras) fueron llevados a cabo en el programa de ordenador SPSS® (IBM SPSS Statistics 22 Software, Inc., Chicago, IL, EEUU), donde las diferencias entre muestras fueron testadas usando el test de Tukey, con un nivel de significancia de $p \leq 0,05$. En otras ocasiones se empleó el test T Student para muestras relacionadas (cuando se comparó únicamente entre dos muestras) empleando el mismo nivel de significancia, $p \leq 0,05$.

8. RESULTADOS

CAPÍTULO 1. PURIFICACIÓN DE FOSFATIDILCOLINA Y ESTANDARIZACIÓN DE LIPOSOMAS

8.1. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y DEL PROCESO DE SONICACIÓN EN LAS PROPIEDADES DE LIPOSOMAS DE LECITINA DE SOJA DE GRADO ALIMENTARIO CON GLICEROL AÑADIDO

Resumen

Se estudió el efecto de los lavados con acetona, dos y cinco veces, de la lecitina de soja (LS) en las propiedades composicionales de fosfatidilcolinas parcialmente purificadas (FC2 y FC5). Cantidades traza de proteína se detectaron en las tres materias primas, con predominancia del ácido glutámico y del ácido aspártico. Incrementando el número de lavados con acetona se disminuyeron los contenidos totales de tocoferoles (α , γ , δ). La reducción de lípidos neutros fue similar ($\approx 90\%$) para FC2 y FC5, mientras que el detrimento de los ácidos grasos libres fue mayor para FC5 (78 %) que para FC2 (71 %). El ácido linoleico fue el constituyente principal tanto de la fracción de lípidos neutros como de la fracción de fosfolípidos para las tres materias primas, representando un 53-59 % del total de ácidos grasos. Sin embargo, el incremento del número de lavados indujo una reducción del contenido de ácido linoleico. Todas las clases de fosfolípidos fueron mayormente concentradas con los dos primeros lavados con acetona. Un mayor número de lavados aumentó la concentración de fosfatidilcolina en FC5 respecto a FC2. Se elaboraron diferentes liposomas conteniendo glicerol, en función de la materia prima (FC2 o FC5) y del método de sonicación (A: 120 W y 5 ciclos; B: 30 W y 2 ciclos) (100 mL de suspensión). Liposomas de lecitina de soja con glicerol (LS con sonicación A) y liposomas sin glicerol (FC5 con sonicación A), se prepararon también como controles. La dispersión liposomal con el mayor grado de purificación y la sonicación más fuerte (L5A) fue claramente distinguida del resto, tanto en tamaño de partícula como en potencial zeta. Los resultados de Calorimetría Diferencial de Barrido mostraron que el glicerol interfiere en la estructura de membrana pero induce mínimos cambios en el tamaño de partícula y la carga de superficie de membrana.

Palabras clave: lecitina de soja, fraccionamiento lipídico, fosfolípidos, fosfatidilcolina, liposomas, sonicación, glicerol.

Introducción

Los liposomas son vesículas lipídicas esféricas coloidales constituidas por una o más bicapas de fosfolípidos englobando un medio acuoso. Han sido muy estudiados como sistemas modelo de membrana, debido a su enorme similitud con las membranas celulares biológicas (Mozafari, 2005). Las propiedades de los liposomas difieren considerablemente en función de la composición lipídica, la carga de superficie, el tamaño y el método de preparación (Akbarzadeh et al., 2013). Las propiedades de los liposomas determinadas por su composición y sus características físico-químicas y estructurales son factores determinantes en sus capacidades como potencial farmacéutico y clínico, así como de sus aplicaciones alimentarias.

Los liposomas pueden ser preparados a partir de una gran variedad de lípidos. Muchos estudios se han llevado a cabo con fosfatidilcolinas sintéticas, tales como dipalmitoilfosfatidilcolina o dimiristoilfosfatidilcolina, con una composición de grupos polares y de ácidos grasos saturados bien definida, que dan lugar a membranas lipídicas estables y bien organizadas (Li et al., 2015). El uso de lípidos no sintéticos, tales como lecitina, para la producción de liposomas no plantea problemas de legislación alimentaria (Laye et al., 2008) y proporciona un importante valor nutricional asociado a la composición rica en ácidos grasos poliinsaturados, los cuales tienen un papel beneficioso en el metabolismo lipídico (Ramdath et al., 2017) y pueden actuar como ingrediente activo contra varias enfermedades, tales como cáncer, riesgo cardiovascular, desórdenes neurológicos, etc. (Küllenberg et al., 2012). Sin embargo, la predominancia de ácidos grasos insaturados da lugar a membranas más permeables y menos estables (Biltonen &

Lichtenberg, 1993), y puede generar hidroperóxidos y productos de oxidación secundaria, cuya acumulación podría aumentar la rancidez y reducir su vida útil (Wang & Wang, 2008).

La presencia de impurezas en la lecitina podría condicionar las propiedades y estabilidad de los liposomas. Los fosfolípidos pueden ser purificados mediante extracciones con solventes orgánicos, siendo la acetona uno de los más empleados. Sin embargo, cantidades variables de compuestos no fosfolipídicos, tales como carbohidratos, esteroides, pigmentos, ácidos grasos libres o triglicéridos podrían permanecer (Van Hoogevest & Wendel, 2014). La presencia de este tipo de impurezas podría ser un inconveniente para la administración de liposomas vía parenteral, aunque sería admisible para el resto de aplicaciones en alimentos.

Los liposomas adquieren muchos tamaños, desde unos pocos nanómetros hasta varias micras. Entre los métodos para producir liposomas, la sonicación es de los más utilizados para obtener vesículas unilamelares pequeñas. Sin embargo, la elevada energía que se requiere podría inducir parte de degradación de los fosfolípidos (Silva et al., 2010).

El glicerol ha sido muy estudiado como crioprotector ya que incrementa la estabilidad de liposomas tras procesos de congelación o secado (Stark et al., 2010). Esta propiedad podría ser de gran importancia para aplicaciones potenciales en alimentos, tales como alimentos funcionales congelados o películas comestibles funcionales desecadas (Alemán et al., 2016). Además, el glicerol modifica la fluidez de membrana, lo que podría ampliar el rango de aplicaciones de los liposomas facilitando su absorción a nivel celular (Manca et al., 2013).

Objetivos

El objetivo de este capítulo es estudiar el efecto de los lavados con acetona (dos lavados y cinco lavados) de la lecitina de soja (LS) en las propiedades composicionales de las fosfatidilcolinas parcialmente purificadas resultantes (FC2 y FC5) y su influencia en las propiedades hidrodinámicas, la carga de superficie de membrana y las propiedades estructurales de sus correspondientes liposomas incorporando glicerol. Los liposomas se prepararon a su vez comparando entre dos métodos de sonicación: A (90 % amplitud y 5 ciclos) y B (20 % amplitud y 2 ciclos). A título comparativo, también se elaboraron liposomas con FC5 y método de sonicación fuerte (A) sin glicerol.

Materiales y métodos

Inicialmente, la lecitina de soja (LS) fue sometida a un proceso de purificación mediante lavados en acetona, obteniéndose dos fosfatidilcolinas parcialmente purificadas, de dos lavados (FC2) y de cinco lavados (FC5).

Se caracterizó su perfil lipídico (fraccionamiento lipídico, composición de ácidos grasos de cada fracción lipídica y clases de fosfolípidos) y otros componentes como el contenido en agua, cenizas, grasa, contenido proteico, perfil aminoacídico y tocoferoles. Además, se estudiaron las propiedades físicas de Calorimetría Diferencial de Barrido (resuspendidas en agua desionizada para una concentración final de 250 mg/mL) y Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier de estas tres materias primas (LS, FC2 y FC5).

Seguidamente, se elaboraron diferentes dispersiones liposomales. Las tres diferencias se basaron en el material encapsulante, el método de sonicación y la presencia de glicerol. Por un lado, se fabricaron liposomas con diferentes materiales encapsulantes: lecitina de soja (LLS), fosfatidilcolina de dos lavados (L2) y fosfatidilcolina de cinco lavados (L5). Por otro lado, dos métodos de sonicación fueron planteados: método intenso (A) con parámetros de 90 % de amplitud (120 W) y 5 ciclos de sonicación o método débil (B) con parámetros de 20 % de amplitud (30 W) y 2 ciclos de sonicación. Finalmente, el crioprotector glicerol fue incorporado

en todas las formulaciones, salvo en una que se denominó con las siglas: ng. De este modo, se obtuvo un total de 6 dispersiones liposomales: LLS, L2A, L2B, L5A, L5B y L5ng. Se estudiaron las propiedades de partícula mediante dispersión dinámica de luz en Zetasizer (dilución 1/10) y microscopía electrónica de transmisión por criofijación (3 μ L), y las propiedades físicas de contenido en agua, dispersabilidad en agua y Calorimetría Diferencial de Barrido (concentradas en un desecador de muestras hasta una concentración final de 250 mg/mL) de las dispersiones. Además, su estabilidad durante 3 semanas en refrigeración (4 °C) fue analizada mediante dispersión dinámica de luz en Zetasizer.

Estas dispersiones se liofilizaron y se estudiaron sus propiedades de partícula mediante Zetasizer (77 mg/mL y posterior dilución 1/10) y microscopía electrónica de transmisión por criofijación (30 mg/mL), así como sus propiedades físicas de contenido en agua, dispersabilidad en agua, colorimetría, Calorimetría Diferencial de Barrido (250 mg/mL) y Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier.

Resultados y discusión

Purificación de fosfatidilcolina a partir de lecitina de soja

Composición

La cuantificación de la composición de la lecitina de soja y las dos fosfatidilcolinas parcialmente purificadas (Tabla 1) mostró que el contenido en agua (humedad) no varió entre muestras ($p>0,05$) con valores comprendidos entre 6,63-5,43 %, así como tampoco lo hizo el contenido en proteína total ($p>0,05$), con valores muy bajos, comprendidos entre 0,29-0,27 %. A pesar de no encontrarse variaciones en el contenido proteico total, sí se observaron a nivel de aminoácidos, donde el ácido glutámico (58,4 %) fue el aminoácido mayoritario en la lecitina de soja, mientras que en los lotes purificados fue la fenilalanina la que más predominó. Esta cantidad y las del resto de aminoácidos disminuyeron notablemente ($p\leq 0,05$) con los procesos de purificación, sin diferencias entre dos y cinco lavados, salvo dos excepciones, la cisteína que se mantuvo estable y la fenilalanina, que incrementó considerablemente ($p\leq 0,05$) sus niveles tras los lavados con acetona, posiblemente debido a su fuerte carácter lipofílico. Por tanto, los aminoácidos mayoritarios en las fosfatidilcolinas parcialmente purificadas fueron el ácido glutámico (51,8 mg/100 g para FC2 y 47,0 mg/100 g para FC5) y la fenilalanina (52,5 mg/100 g para FC2 y 48,4 mg/100 g para FC5).

El contenido de cenizas se incrementó ($p\leq 0,05$) desde 6,70 % en LS hasta 10,77 % y 10,05 % para FC2 y FC5 (sin diferencias entre lavados), respectivamente, lo que se atribuye a que al aumentar la concentración de fosfolípidos con los lavados, se aumenta también la de los grupos fosfato (grupos unidos a fosfolípidos), que se consideran responsables en gran medida del aumento en cenizas. El contenido de grasa total disminuyó significativamente ($p\leq 0,05$) desde 75,06 % para LS hasta 68,55 % para FC2 y 67,71 % para FC5, posiblemente debido a que el concentrar los fosfolípidos implica la eliminación de otras fracciones lipídicas como son los lípidos neutros y/o los ácidos grasos libres. Además, en el proceso de purificación se pueden producir pérdidas o variaciones de los componentes lipídicos, ya sean lípidos polares atrapados en la fase descartada o compuestos no lipídicos (carbohidratos y azúcares) asociados a lípidos que quedan en la muestra recolectada, disminuyendo así el contenido relativo de grasa total.

El contenido en tocoferoles (compuestos orgánicos antioxidantes), fue elevado en la lecitina de soja (92,61 mg/100 g) con predominancia del γ -tocoferol (65,17 mg/100 g), seguido del δ -tocoferol (24,49 mg/100 g) y del α -tocoferol (2,95 mg/100 g). Esta tendencia fue encontrada también en ambas fosfatidilcolinas parcialmente purificadas, sin embargo, los valores cayeron drásticamente ($p\leq 0,05$) con los lavados hasta valores totales de 5,80 mg/100 g para FC2 y 1,05 mg/100 g para FC5, demostrando una mayor reducción con mayor número de

purificaciones ($p \leq 0,05$). Esta disminución del tocoferol fue totalmente esperable dado el reconocido efecto solubilizante de la acetona sobre los tocoferoles (Wayno et al., 2016). A pesar de ello, los contenidos de tocoferoles fueron notablemente más altos que los obtenidos por Wang & Wang (2008) para lecitina de soja comercial purificada con lavados de acetona.

Tabla 1. Composición de lecitina de soja (LS) y fosfatidilcolina parcialmente purificada después de dos lavados (FC2) y de cinco lavados (FC5). Diferentes letras (a, b, c) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre muestras.

| | LS | FC2 | FC5 |
|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Composición (%) | | | |
| Grasa | 75,06 ± 1,05 ^a | 68,55 ± 1,95 ^b | 67,71 ± 1,42 ^b |
| Cenizas | 6,70 ± 0,21 ^a | 10,77 ± 0,85 ^b | 10,05 ± 0,10 ^b |
| Humedad | 6,63 ± 1,23 ^a | 5,72 ± 0,98 ^a | 5,43 ± 1,11 ^a |
| Proteína | 0,28 ± 0,01 ^a | 0,29 ± 0,01 ^a | 0,27 ± 0,01 ^a |
| Aminoácidos (mg/100 g) | | | |
| Ácido aspártico | 39,7 ± 1,6 ^a | 33,0 ± 1,7 ^b | 31,3 ± 1,3 ^b |
| Treonina | 11,4 ± 0,5 ^a | 9,5 ± 0,4 ^b | 8,8 ± 0,4 ^b |
| Serina | 25,2 ± 1,3 ^a | 20,6 ± 0,8 ^b | 20,0 ± 1,2 ^b |
| Ácido glutámico | 58,4 ± 2,8 ^a | 51,8 ± 2,2 ^b | 47,0 ± 2,5 ^b |
| Glicina | 14,1 ± 0,6 ^a | 11,6 ± 0,5 ^b | 10,9 ± 0,5 ^b |
| Alanina | 15,9 ± 0,8 ^a | 13,2 ± 0,7 ^b | 12,4 ± 0,5 ^b |
| Cisteína | 1,2 ± 0,1 ^{ab} | 1,0 ± 0,1 ^a | 1,3 ± 0,1 ^b |
| Valina | 15,5 ± 0,9 ^a | 12,6 ± 0,5 ^b | 11,9 ± 0,6 ^b |
| Metionina | 2,4 ± 0,1 ^a | 2,0 ± 0,1 ^b | 1,6 ± 0,1 ^c |
| Isoleucina | 9,6 ± 0,4 ^a | 7,7 ± 0,4 ^b | 7,3 ± 0,3 ^b |
| Leucina | 17,2 ± 1,1 ^a | 14,3 ± 0,7 ^b | 13,4 ± 0,7 ^b |
| Tirosina | 7,9 ± 0,5 ^a | 6,8 ± 0,4 ^b | 5,0 ± 0,2 ^c |
| Fenilalanina | 15,4 ± 0,9 ^a | 52,5 ± 2,5 ^b | 48,4 ± 2,8 ^b |
| Histidina | 12,3 ± 0,7 ^a | 9,8 ± 0,3 ^b | 7,7 ± 0,4 ^c |
| Lisina | 24,3 ± 1,0 ^a | 18,7 ± 1,0 ^b | 17,2 ± 1,0 ^b |
| Arginina | 21,0 ± 1,0 ^a | 17,1 ± 1,0 ^b | 16,6 ± 0,9 ^b |
| Prolina | 12,0 ± 0,6 ^a | 10,2 ± 0,5 ^b | 9,7 ± 0,5 ^b |
| Tocoferoles (mg/100 g) | | | |
| γ-tocoferol | 65,17 ± 2,83 ^a | 3,93 ± 0,13 ^b | 0,72 ± 0,01 ^c |
| δ-tocoferol | 24,49 ± 0,94 ^a | 1,67 ± 0,02 ^b | 0,28 ± 0,00 ^c |
| α-tocoferol | 2,95 ± 0,01 ^a | 0,18 ± 0,00 ^b | 0,04 ± 0,00 ^c |

Perfil lipídico

Inicialmente se separaron las tres fracciones lipídicas mayoritarias en cada una de las materias primas: lípidos neutros, ácidos grasos libres y fosfolípidos (Figura 29). La lecitina de soja mostró un 4,1 % de ácidos grasos libres, los cuales vieron mermada su cantidad ($p \leq 0,05$) hasta valores de 1,2 % y 0,9 % para FC2 y FC5 (reducciones del 71 % y del 78 %, respectivamente). De igual manera, los valores de lípidos neutros (38,3 % para LS) se desplomaron ($p \leq 0,05$) con los procesos de purificación, reduciéndose en ambas fosfatidilcolinas un 90 % respecto a su cantidad inicial. En contraposición, la fracción de fosfolípidos aumentó ($p \leq 0,05$) desde 57,6 % en LS hasta un ≈95 % para FC2 y FC5, sin diferencias significativas entre ellas. Con estos resultados se constata la evidente purificación en fosfolípidos llevada a cabo. Resultados similares de concentración de la fracción fosfolipídica fueron obtenidos por Van Hoogevest & Wendel (2014).

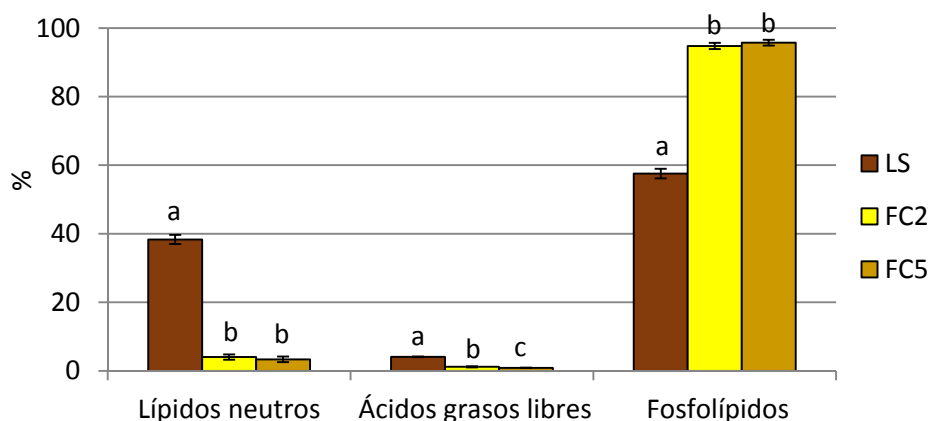


Figura 29. Determinación de las principales fracciones lipídicas (lípidos neutros, ácidos grasos libres y fosfolípidos) en lecitina de soja (LS) y fosfatidilcolina parcialmente purificada de dos lavados (FC2) y de cinco lavados (FC5). Diferentes letras (a, b, c) indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre muestras.

Posteriormente, mediante cromatografía de gases se estudió la composición de ácidos grasos de cada una de estas fracciones en cada muestra, encontrándose cinco ácidos grasos mayoritarios en todas ellas: ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1n9c), ácido linoleico (C18:2n6c) y ácido linolénico (C18:3n3). Estos resultados así como los sumatorios de ácidos grasos saturados y ácidos grasos insaturados (tanto mono- como poliinsaturados) se muestran en la tabla 2. Lee et al. (2015) encontraron composiciones de ácidos grasos similares para lecitina de soja comercial y fosfatidilcolinas parcialmente purificadas con acetona.

Las fracciones de lípidos neutros y ácidos grasos libres presentaron una disminución de ácidos grasos ($p \leq 0,05$) tras los lavados con acetona respecto a la lecitina (LS), siendo más significativa la reducción a mayor número de lavados, incluso para el ácido graso mayoritario en las tres fracciones (ácido linoleico, C18:2n6c), el cual representó un 53-59 % del total de ácidos grasos. Esta tendencia de decremento se mantiene en el sumatorio de ácidos grasos saturados e insaturados, siendo mayor en el caso de los insaturados, probablemente debido a su elevada polaridad, descartándose en mayor medida tras los sucesivos lavados con acetona.

Finalmente, se llevó a cabo una estimación de las clases de fosfolípidos presentes en las muestras mediante cromatografía de líquidos/espectrometría de masas acoplada a un analizador de tipo cuadrupolo. Se consideró la combinación de las siete clases de fosfolípidos existentes (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, liso-fosfatidilcolina, liso-fosfatidiletanolamina y ácido fosfatídico) con los cinco ácidos grasos predominantes encontrados en la lecitina y las fosfatidilcolinas testadas (ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico). El análisis evidenció 41 compuestos (de los 85 posibles) presentes en las tres materias primas (Tabla 3).

Tabla 2. Composición de ácidos grasos de las tres fracciones lipídicas principales (lípidos neutros, ácidos grasos libres y fosfolípidos) de lecitina de soja (LS) y fosfatidilcolinas parcialmente purificadas de dos lavados (FC2) y de cinco lavados (FC5). C16:0 = ácido palmítico, C18:0 = ácido esteárico, C18:1n9c = ácido oleico, C18:2n6c = ácido linoleico, C18:3n3 = ácido linolénico, Σ Ác. grasos saturados = sumatorio de ácidos grasos saturados, Σ Ác. grasos insaturados = sumatorio de ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados. Diferentes letras (a, b, c) en la misma fila indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre muestras para cada fracción lipídica.

| | Lípidos neutros (mg/g muestra) | | |
|---------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | LS | FC2 | FC5 |
| C16:0 | 34,12 \pm 1,50 ^a | 4,18 \pm 0,01 ^b | 3,67 \pm 0,39 ^c |
| C18:0 | 13,37 \pm 0,61 ^a | 1,23 \pm 0,02 ^b | 0,96 \pm 0,04 ^c |
| C18:1n9c | 56,20 \pm 2,77 ^a | 2,49 \pm 0,14 ^b | 1,41 \pm 0,03 ^c |
| C18:2n6c | 162,50 \pm 6,94 ^a | 10,73 \pm 0,72 ^b | 8,26 \pm 0,12 ^c |
| C18:3n3 | 26,25 \pm 1,18 ^a | 1,58 \pm 0,09 ^b | 1,18 \pm 0,01 ^c |
| Σ Ác. Grasos saturados | 47,50 \pm 2,11 ^a | 5,41 \pm 0,03 ^b | 4,63 \pm 0,43 ^c |
| Σ Ác. Grasos insaturados | 244,95 \pm 10,89 ^a | 14,79 \pm 0,95 ^b | 10,85 \pm 0,14 ^c |

| | Ácidos grasos libres (mg/g muestra) | | |
|---------------------------------|--|------------------------------|------------------------------|
| | LS | FC2 | FC5 |
| C16:0 | 5,35 \pm 0,22 ^a | 1,91 \pm 0,14 ^b | 1,72 \pm 0,09 ^c |
| C18:0 | 2,50 \pm 0,07 ^a | 1,24 \pm 0,15 ^b | 1,23 \pm 0,05 ^b |
| C18:1n9c | 6,03 \pm 0,12 ^a | 1,20 \pm 0,09 ^b | 0,64 \pm 0,30 ^c |
| C18:2n6c | 16,28 \pm 0,65 ^a | 1,56 \pm 0,24 ^b | 0,56 \pm 0,31 ^c |
| C18:3n3 | 1,23 \pm 0,02 ^a | 0,13 \pm 0,01 ^b | 0,07 \pm 0,01 ^c |
| Σ Ác. Grasos saturados | 7,85 \pm 0,29 ^a | 3,15 \pm 0,29 ^b | 2,95 \pm 0,14 ^b |
| Σ Ác. Grasos insaturados | 23,53 \pm 0,79 ^a | 2,89 \pm 0,34 ^b | 1,27 \pm 0,62 ^c |

| | Fosfolípidos (mg/g muestra) | | |
|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | LS | FC2 | FC5 |
| C16:0 | 88,40 \pm 0,04 ^a | 97,72 \pm 22,88 ^a | 92,38 \pm 20,76 ^a |
| C18:0 | 20,10 \pm 0,01 ^a | 22,15 \pm 5,64 ^a | 20,91 \pm 4,65 ^a |
| C18:1n9c | 36,84 \pm 0,51 ^a | 40,74 \pm 10,11 ^a | 38,14 \pm 9,01 ^a |
| C18:2n6c | 259,86 \pm 4,89 ^a | 287,95 \pm 71,42 ^a | 267,64 \pm 62,81 ^a |
| C18:3n3 | 33,69 \pm 0,67 ^a | 37,18 \pm 9,18 ^a | 34,20 \pm 8,09 ^a |
| Σ Ác. Grasos saturados | 108,50 \pm 0,05 ^a | 119,87 \pm 28,52 ^a | 113,29 \pm 25,41 ^a |
| Σ Ác. Grasos insaturados | 330,39 \pm 6,08 ^a | 365,88 \pm 90,71 ^a | 339,99 \pm 79,92 ^a |

Tabla 3. Identificación de las diferentes especies de fosfolípidos encontradas en lecitina de soja (LS) y fosfatidilcolina parcialmente purificada después de dos lavados (FC2) y de cinco lavados (FC5).

| Cabeza polar | Combinación de ácidos grasos | Fórmula |
|-------------------|------------------------------|------------|
| Colina | C16:0/C18:3n3 | C42H78O8NP |
| Colina | C16:0/C18:2n6c | C42H80O8NP |
| Colina | C16:0/C18:1n9c | C42H82O8NP |
| Colina | C18:3n3/C18:3n3 | C44H76O8NP |
| Colina | C18:2n6c/C18:3n3 | C44H78O8NP |
| Colina | C18:2n6c/C18:2n6c | C44H80O8NP |
| Colina | C18:3n3/C18:1n9c | C44H80O8NP |
| Colina | C18:0/C18:3n3 | C44H82O8NP |
| Colina | C18:2n6c/C18:1n9c | C44H82O8NP |
| Colina | C18:0/C18:2n6c | C44H84O8NP |
| Colina | C18:1n9c/C18:1n9c | C44H84O8NP |
| Colina | C18:0/C18:1n9c | C44H86O8NP |
| Etanolamina | C16:0/C18:3n3 | C39H71O8NP |
| Etanolamina | C16:0/C18:2n6c | C39H73O8NP |
| Etanolamina | C16:0/C18:1n9c | C39H75O8NP |
| Etanolamina | C18:2n6c/C18:3n3 | C41H71O8NP |
| Etanolamina | C18:2n6c/C18:2n6c | C41H73O8NP |
| Etanolamina | C18:3n3/C18:1n9c | C44H73O8NP |
| Etanolamina | C18:0/C18:3n3 | C41H75O8NP |
| Etanolamina | C18:2n6c/C18:1n9c | C41H75O8NP |
| Etanolamina | C18:0/C18:2n6c | C41H77O8NP |
| Etanolamina | C18:1n9c/C18:1n9c | C41H77O8NP |
| Inositol | C16:0/C18:3n3 | C43H76O13P |
| Inositol | C16:0/C18:2n6c | C43H78O13P |
| Inositol | C16:0/C18:1n9c | C43H80O13P |
| Inositol | C18:2n6c/C18:3n3 | C45H76O13P |
| Inositol | C18:2n6c/C18:2n6c | C45H78O13P |
| Inositol | C18:3n3/C18:1n9c | C45H78O13P |
| Inositol | C18:0/C18:3n3 | C45H80O13P |
| Inositol | C18:2n6c/C18:1n9c | C45H80O13P |
| Inositol | C18:0/C18:2n6c | C45H82O13P |
| Inositol | C18:1n9c/C18:1n9c | C45H82O13P |
| Ácido fosfatídico | C16:0/C18:1n9c | C37H68O7P |
| Ácido fosfatídico | C18:0/C18:3n3 | C39H68O7P |
| Ácido fosfatídico | C18:2n6c/C18:1n9c | C39H68O7P |
| Liso-Colina | C16:0 | C24H50O7NP |
| Liso-Colina | C18:3n3 | C26H48O7NP |
| Liso-Colina | C18:2n6c | C26H50O7NP |
| Liso-Colina | C18:1n9c | C26H52O7NP |
| Liso-Colina | C18:0 | C26H54O7NP |
| Liso-Etanolamina | C18:2n6c | C23H43O7NP |

Seguidamente, se realizó el sumatorio, en términos de intensidad de señal, para cada clase de fosfolípido y se expresaron los resultados de las distintas clases de fosfolípidos presentes en LS, FC2 y FC5, tanto en polaridad positiva (A) como en polaridad negativa (B) (Figura 30).

La fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, liso-fosfatidilcolina y liso-fosfatidiletanolamina ionizaron preferentemente en polaridad positiva mientras que el fosfatidilinositol y ácido

fosfatídico lo hicieron en polaridad negativa, no siendo detectada en ningún caso señal de fosfatidilserina. Todas las clases de fosfolípidos detectadas mostraron un incremento ($p \leq 0,05$) de su concentración en las muestras lavadas con acetona (corroborando el aumento de la concentración total de fosfolípidos cuantificado previamente), no mostrando diferencias significativas en función del número de lavados y siendo los más abundantes el ácido fosfatídico en polaridad negativa y la fosfatidilcolina en polaridad positiva. Semejantes resultados fueron descritos por Sikorski & Kolakowska (2003), observando cantidades notables de fosfolípidos aniónicos y niveles abundantes de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina.

La fosfatidilcolina fue la clase de fosfolípido predominante (en intensidad de señal, pues las comparaciones absolutas de concentración no fueron posibles de determinar), superando en 164 veces a la siguiente en intensidad de señal, el fosfatidilinositol. Este hecho permite confirmar que las muestras obtenidas a partir de la lecitina que soja fueron altamente ricas en fosfatidilcolina, además de contar con la presencia de otros fosfolípidos en menor cantidad. Otro aspecto importante que se extrae de este análisis es que en la fosfatidilcolina se observan diferencias ($p \leq 0,05$) entre FC2 y FC5, habiendo mayor cantidad en la de mayor número de lavados.

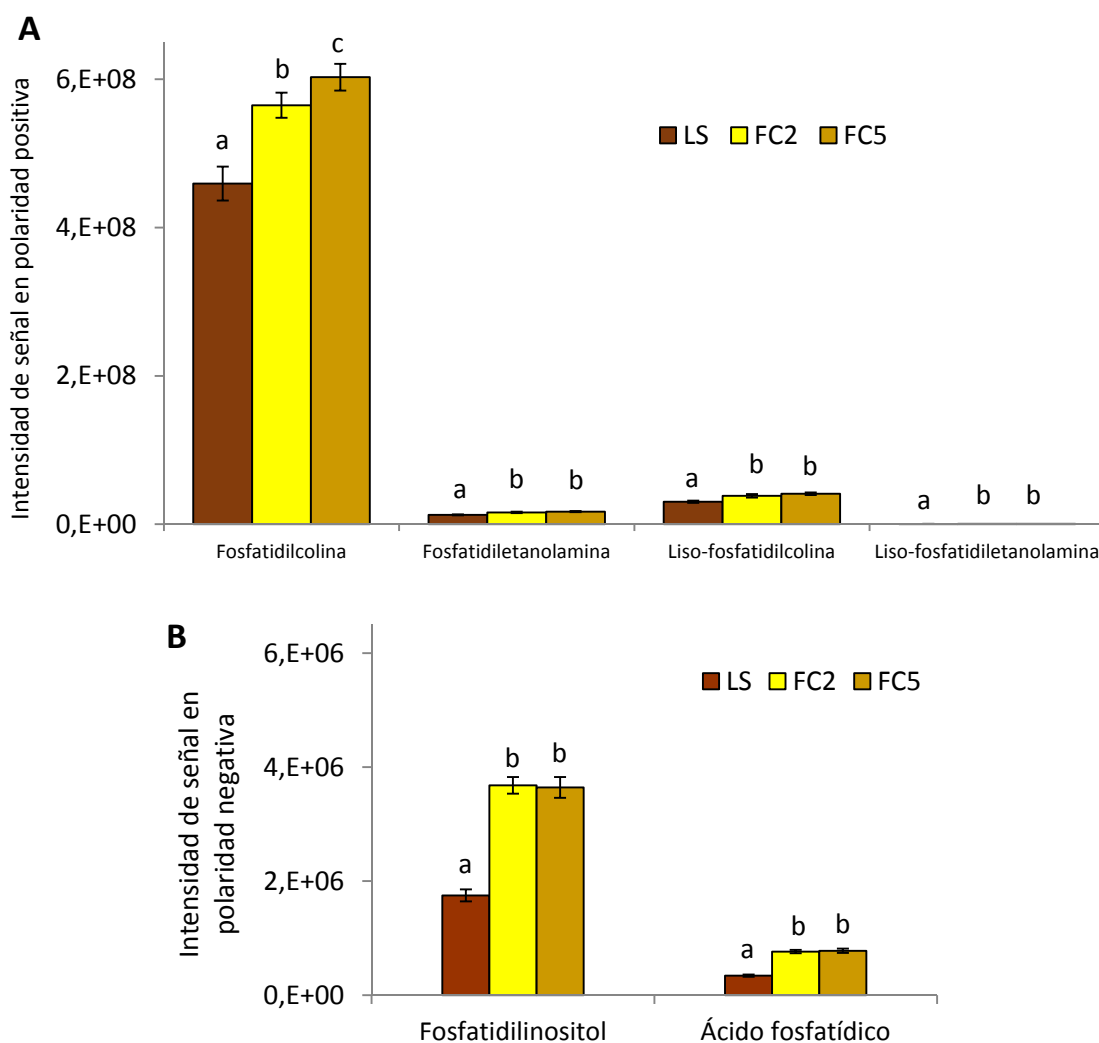


Figura 30. Composición de clases de fosfolípidos, expresados como intensidad de señal en polaridad positiva (A) y negativa (B), de lecitina de soja (LS) y fosfatidilcolina parcialmente purificada de dos lavados (FC2) y de cinco lavados (FC5). Diferentes letras (a, b, c) indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre muestras para cada clase de fosfolípido.

Calorimetría Diferencial de Barrido

En la figura 31 se muestran las transiciones de fase analizadas mediante Calorimetría Diferencial de Barrido de las tres materias primas (LS, FC2 y FC5) dispersas en agua, así como su temperatura media de transición (T_1 , °C) y su entalpía (ΔH , J/g) asociada.

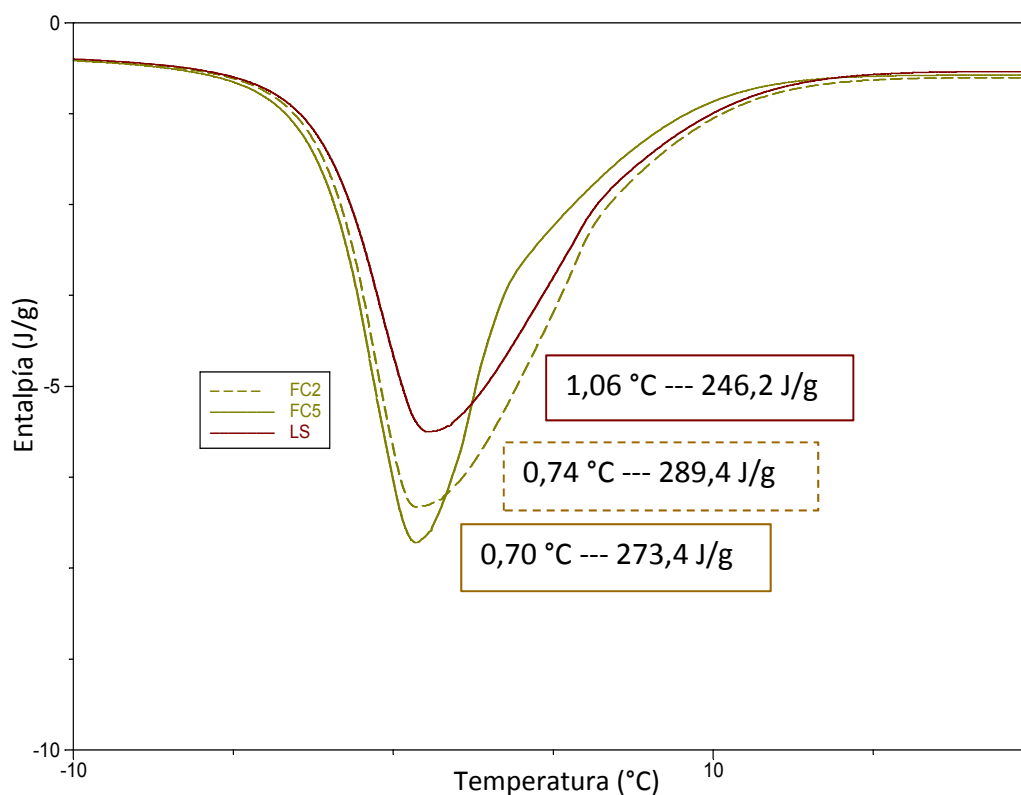


Figura 31. Cambios de temperatura (°C) y entalpía (ΔH , J/g) de las transiciones de fase endotérmicas analizadas por Calorimetría Diferencial de Barrido de dispersiones acuosas de lecitina de soja (LS) y de fosfatidilcolina parcialmente purificada de dos lavados (FC2) y de cinco lavados (FC5).

Los datos reflejan una única transición de fase endotérmica (analizado el rango de temperatura desde -35 °C hasta 90 °C) muy marcada para cada una de las muestras. Esta única transición se corresponde con la fase de fusión del agua externa, es decir, el agua contenida en la suspensión concentrada y no la que pueda haber dentro de las propias muestras, ya que la temperatura se sitúa entre ≈ 0 -1 °C, donde es característica la fusión del agua (0 °C). Esta transición hace referencia a la interacción entre las moléculas de agua de la suspensión y los lípidos expuestos de las materias primas.

La gráfica muestra una T_1 para la lecitina de soja de 1,06 °C mientras que FC2 y FC5 presentaron valores significativamente inferiores, de 0,74 °C y 0,70 °C, respectivamente. Este descenso de T_1 fue acompañado de un incremento en la entalpía (ΔH), tal y como se ve en la figura 31, donde FC2 y FC5 presentaron una entalpía similar (289,4 J/g y 273,4 J/g, respectivamente) ligeramente superior a la de la lecitina de soja (246,2 J/g). Estos datos podrían correlacionarse con una mayor concentración de fosfolípidos altamente insaturados en las muestras sometidas a lavados con acetona, siendo mayor la concentración para FC5.

Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier

Los espectros infrarrojos (Figura 32) presentaron diferencias entre las muestras para determinados grupos funcionales, demostrando una mayor concentración de fosfolípidos tras los procesos de purificación.

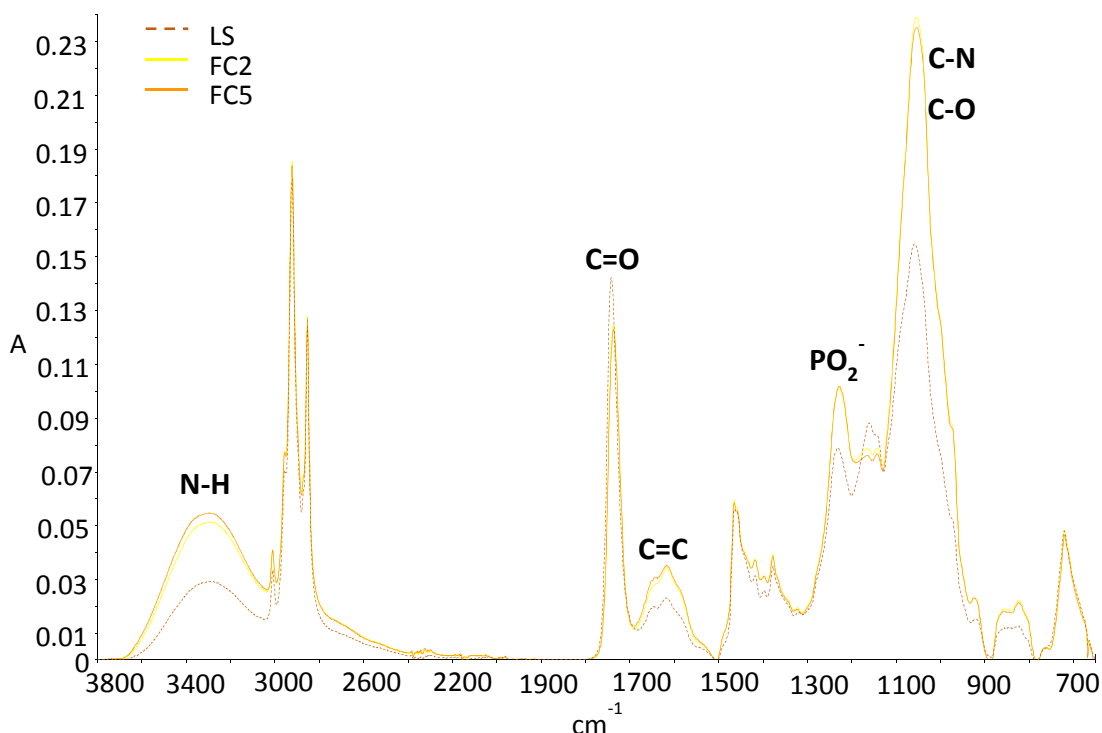


Figura 32. Espectro Infrarrojo con Transformada de Fourier de lecitina de soja (LS) y fosfatidilcolina parcialmente purificada de dos lavados (FC2) y de cinco lavados (FC5).

Por ejemplo, la banda de absorción a $\approx 3270 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente a las vibraciones de los grupos O-H y N-H tuvo una clara mayor absorbancia para ambas fosfatidilcolinas parcialmente purificadas. Se descarta que esta mayor detección se deba al contenido residual de agua o al contenido total de tocoferoles (y por tanto con los grupos O-H) puesto que el contenido en agua es constante en las tres muestras y los tocoferoles se reducen con los procesos de lavado. Por esta razón, el incremento de absorbancia se atribuye fundamentalmente a los grupos N-H presentes en las cabezas polares de los fosfolípidos. Coincide además que la banda de FC5 es algo mayor que la de FC2, indicando un mayor grado de purificación.

De igual modo sucede con otras bandas de absorción como la de $\approx 1740 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente a la vibración de los grupos ésteres C=O, que disminuye en FC2 y FC5 respecto a LS. Este descenso se correlaciona con la disminución de la cantidad de triglicéridos (lípidos neutros) en ambas fosfatidilcolinas, tal y como se vio en los estudios anteriores.

Las bandas de absorción a $\approx 1655 \text{ cm}^{-1}$ (grupos C=C), $\approx 1230 \text{ cm}^{-1}$ (grupos fosfato PO_2^-) y $\approx 1050 \text{ cm}^{-1}$ (grupos C-O y grupos C-N) presentaron una notable absorbancia mayor para ambas fosfatidilcolinas que para la lecitina de soja. Esta mayor detección fue debida a una mayor cantidad de moléculas *cis*-olefinas, asociadas a los ácidos grasos que conforman los fosfolípidos (C=C), de grupos fosfato localizados en las cabezas polares de los fosfolípidos (PO_2^-), de grupos de glicerol también presentes en fosfolípidos (C-O) y de grupos colina presentes en la fosfatidilcolina (C-N). Todas estas variaciones en la composición de los grupos funcionales sugieren una purificación de la fracción fosfolipídica (fosfatidilcolina) tras los lavados con acetona.

Una consideración a tener en cuenta es que la banda de absorción a $\approx 1740 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente a los grupos C=O también podría englobar productos de oxidación secundaria como son aldehídos y cetonas, referenciados por absorber en este rango de absorbancia (Guillén & Cabo, 2004). Es sabido que los lípidos son muy susceptibles de sufrir oxidación lipídica y en este caso en particular los procesos de purificación con acetona podrían causar cierto estrés oxidativo en

las muestras, ya que son muy ricas en ácidos grasos mono- y poliinsaturados. Además, los niveles de tocoferol (un reconocido compuesto con poder antioxidante) se vieron reducidos con los lavados en acetona. Este hecho hay que tenerlo en cuenta a la hora de estudiar la estabilidad de los liposomas o bien prevenir la oxidación mediante la incorporación en las formulaciones de compuestos para tal fin.

A continuación se procederá a la estandarización del proceso de elaboración de los liposomas.

Dispersiones liposomales

Características de partícula

Las características de partícula (tamaño medio, índice de polidispersidad y potencial zeta), analizadas mediante dispersión dinámica de luz, de las seis dispersiones liposomales se muestran en la tabla 4. El tamaño medio de los liposomas se situó en un rango nanométrico, entre 74,3 y 132,4 nm. Has et al. (2018) establece que un tamaño de vesículas entre 100-200 nm para una solución liposomal es un tamaño muy adecuado para aplicaciones en las que esté implicada la carga de sustancias o medicamentos. Drazenovic et al. (2015) encontraron tamaños similares para liposomas elaborados mediante sonicación.

Tabla 4. Tamaño medio (nm), índice de polidispersidad y potencial zeta (mV) de las dispersiones liposomales (LLS, L2A, L2B, L5A, L5B, L5Ang) a diferentes tiempos de conservación (4°C) (en semanas). Diferentes letras (a, b, c, d, e, f) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre liposomas para un mismo tiempo de conservación. Diferentes letras (m, n, o) en la misma fila indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre diferentes tiempos de conservación para una misma formulación liposomal.

| | | Tiempo de conservación | | | |
|-------------------------|-------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| | | 0 semanas | 1 semana | 2 semanas | 3 semanas |
| Tamaño (nm) | LLS | 132,4 \pm 0,6 ^{e/m} | 140,8 \pm 1,5 ^{e/n} | 141,9 \pm 0,1 ^{f/no} | 143,5 \pm 1,2 ^{e/o} |
| | L2A | 108,5 \pm 0,4 ^{d/m} | 106,3 \pm 1,0 ^{d/n} | 106,1 \pm 0,9 ^{e/n} | 105,2 \pm 1,2 ^{d/n} |
| | L2B | 102,1 \pm 0,5 ^{c/n} | 100,5 \pm 0,3 ^{c/m} | 101,0 \pm 0,8 ^{c/n} | 102,8 \pm 1,1 ^{c/o} |
| | L5A | 87,4 \pm 0,8 ^{b/m} | 85,7 \pm 0,0 ^{b/n} | 86,2 \pm 0,9 ^{b/mn} | 86,9 \pm 0,1 ^{b/mn} |
| | L5B | 101,9 \pm 0,5 ^{c/mn} | 101,2 \pm 0,2 ^{c/m} | 103,0 \pm 1,2 ^{d/n} | 106,6 \pm 0,3 ^{d/o} |
| | L5Ang | 74,3 \pm 0,3 ^{a/m} | 74,0 \pm 0,6 ^{a/m} | 74,2 \pm 0,7 ^{a/m} | 73,9 \pm 0,8 ^{a/m} |
| Polidispersidad | LLS | 0,222 \pm 0,007 ^{ab/m} | 0,217 \pm 0,016 ^{b/m} | 0,187 \pm 0,012 ^{b/n} | 0,186 \pm 0,009 ^{a/n} |
| | L2A | 0,171 \pm 0,013 ^{a/m} | 0,151 \pm 0,017 ^{a/m} | 0,157 \pm 0,010 ^{a/m} | 0,171 \pm 0,019 ^{a/m} |
| | L2B | 0,235 \pm 0,016 ^{b/m} | 0,241 \pm 0,002 ^{b/m} | 0,240 \pm 0,012 ^{c/m} | 0,240 \pm 0,010 ^{b/m} |
| | L5A | 0,240 \pm 0,005 ^{bc/m} | 0,241 \pm 0,007 ^{b/m} | 0,230 \pm 0,007 ^{c/m} | 0,246 \pm 0,010 ^{b/m} |
| | L5B | 0,244 \pm 0,008 ^{bc/m} | 0,240 \pm 0,004 ^{b/m} | 0,244 \pm 0,005 ^{c/m} | 0,254 \pm 0,009 ^{b/m} |
| | L5Ang | 0,266 \pm 0,009 ^{c/m} | 0,241 \pm 0,004 ^{b/n} | 0,246 \pm 0,006 ^{c/n} | 0,251 \pm 0,010 ^{b/mn} |
| Potencial Z (mV) | LLS | -44,3 \pm 0,2 ^{b/m} | -42,4 \pm 1,9 ^{abc/m} | -38,2 \pm 0,6 ^{b/n} | -37,2 \pm 0,1 ^{b/n} |
| | L2A | -44,3 \pm 4,5 ^{b/m} | -38,4 \pm 0,6 ^{ab/m} | -38,9 \pm 2,9 ^{b/m} | -30,2 \pm 0,9 ^{a/n} |
| | L2B | -41,5 \pm 2,8 ^{b/m} | -46,9 \pm 3,8 ^{c/m} | -31,6 \pm 2,4 ^{a/n} | -30,3 \pm 0,7 ^{a/n} |
| | L5A | -35,5 \pm 1,7 ^{a/m} | -38,9 \pm 1,1 ^{ab/mn} | -43,7 \pm 3,7 ^{b/n} | -36,1 \pm 2,1 ^{b/m} |
| | L5B | -42,1 \pm 1,3 ^{b/m} | -44,6 \pm 4,1 ^{bc/m} | -31,6 \pm 2,3 ^{a/n} | -29,3 \pm 1,9 ^{a/n} |
| | L5Ang | -34,5 \pm 1,9 ^{a/m} | -36,4 \pm 1,7 ^{a/m} | -40,7 \pm 2,9 ^{b/m} | -36,6 \pm 4,0 ^{b/m} |

Los liposomas de lecitina de soja (LLS) presentaron un mayor ($p \leq 0,05$) tamaño medio de vesícula (132,4 nm), seguramente atribuido a una mayor presencia de impurezas que en el resto de

formulaciones, es decir, de componentes no fosfolipídicos como tocoferol o triglicéridos, los cuales quedan atrapados aleatoriamente dentro de los liposomas, ya sea en el núcleo acuoso o en la bicapa lipídica, provocando un notable aumento del tamaño medio (Michelson et al., 2016). En cambio, los liposomas L5A y L5Ang presentaron un tamaño medio de vesícula significativamente menor (87,4 nm y 74,3 nm, respectivamente) que el resto de formulaciones (L2A, L2B y L5B), que tuvieron tamaños intermedios de 108,5, 102,1 y 101,9 nm, respectivamente. Por tanto, no parece haber una relación clara en función del material encapsulante o del método de sonicación, pero se deduce que la combinación de fosfatidilcolina más purificada (de cinco lavados, FC5) con una mayor intensidad y mayor tiempo de sonicación (método de sonicación A) parece contribuir a reducir el tamaño de vesícula (formulaciones L5A). Da Silva Malheiros et al. (2010) también observaron una merma lineal del tamaño de vesícula como resultado del incremento progresivo del tiempo e intensidad de sonicación.

Entre dispersiones L5A, los liposomas con glicerol (L5A) presentaron un tamaño mayor ($p \leq 0,05$) que los liposomas sin este compuesto (L5Ang) posiblemente debido a la propia presencia de glicerol, el cual quedaría asociado a la bicapa aumentando el tamaño medio. Esta conclusión coincidiría con los resultados obtenidos por Manca et al. (2013), quienes demostraron un aumento del tamaño de liposomas cuando las concentraciones de glicerol superaban el 20 % (en los liposomas del presente trabajo es del 37,5 %). Sin embargo, la presencia de glicerol en las dispersiones liposomales puede favorecer la estabilidad de las vesículas sometidas a procesos de desecación (Mozafari, 2005).

El índice de polidispersidad refleja la heterogeneidad de tamaños de partícula de las dispersiones liposomales. Todas ellas mostraron una típica distribución monomodal (Figura 33) con una única población definida, indicativo de una buena polidispersidad. Estos resultados fueron corroborados por los valores de la tabla 4, donde el índice de polidispersidad osciló entre 0,171 y 0,266. Acorde a da Silva Malheiros et al. (2010), quienes definen un buen índice de polidispersidad entre 0,200 y 0,300 para sistemas preparados a partir de material biológico, nuestros liposomas tuvieron un índice de polidispersidad dentro del rango típico y por tanto, una distribución homogénea. No se observaron diferencias significativas en función del material encapsulante, del método de sonicación o de la presencia de glicerol.

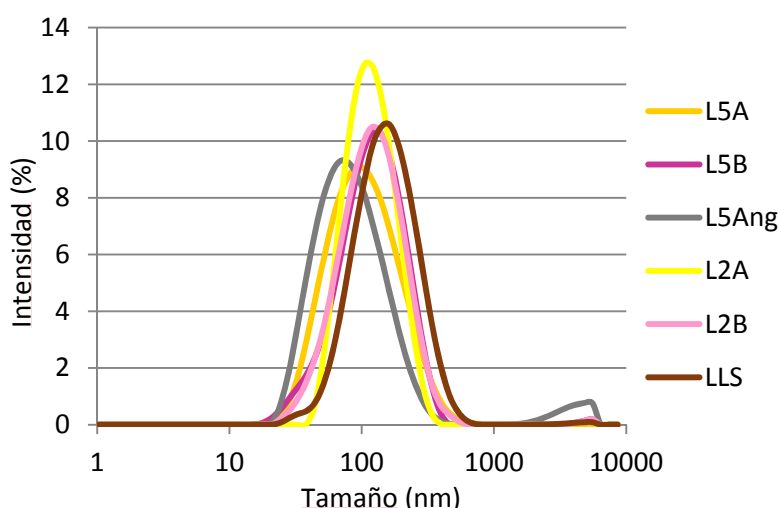


Figura 33. Distribución de tamaños de partícula de las dispersiones liposomales (L5A, L5B, L5Ang, L2A, L2B, LLS).

El potencial zeta (Tabla 4) representa la estabilidad de las vesículas en función de la carga electrostática de su superficie de membrana. Según Müller et al. (2001), vesículas con valores de potencial inferiores a -30 mV son consideradas vesículas muy estables. Dado que todas las

dispersiones liposomales ensayadas mostraron valores más electronegativos (-34,5 hasta -44,3 mV) que el límite definido por Müller, todos los liposomas pueden ser considerados como vesículas con una muy elevada estabilidad de partícula.

La razón de que la carga neta de la membrana de los liposomas sea negativa es debida a que, aunque el fosfolípido mayoritario, la fosfatidilcolina, tiene carga cero (las cargas positivas del grupo colina son contrarrestadas por las cargas negativas de los grupos fosfato), se han podido identificar la presencia de fosfolípidos aniónicos (fosfatidilinositol) con carga negativa. Además, algunas impurezas, como trazas de proteína o tocoferol, también pueden contribuir a que el potencial zeta sea más electronegativo (McClements, 2016). El hecho de que la carga electrostática de la superficie de membrana de los liposomas sea negativa puede implicar ciertas ventajas para determinadas aplicaciones, como por ejemplo, que éstos tengan más facilidades de penetración en la piel (Ogiso et al., 2001).

No se ha encontrado una relación directa entre el potencial zeta y la materia prima empleada o la intensidad de sonicación, si bien es cierto que las dispersiones L5A y L5Ang fueron las que presentaron un significativo menor potencial de membrana, con valores de -35,5 mV y -34,5 mV, respectivamente. Estas dos dispersiones liposomales coinciden con las preparaciones de menor tamaño de partícula. Sin embargo, dado que el valor del potencial zeta es inferior a -30 mV, la estabilidad vesicular se sigue considerando muy elevada. Por otro lado, se descarta que el glicerol influya de manera significativa en el potencial de membrana y que afecte negativamente a la estabilidad de las vesículas, tal y como demostró previamente Manca et al. (2013).

Conservación en refrigeración

En la tabla 4 se muestran también los parámetros de tamaño, polidispersidad y potencial zeta de las mismas dispersiones liposomales conservadas durante 3 semanas en refrigeración a 4 °C. Tras 3 semanas, el tamaño medio se mantuvo estable para todas las dispersiones liposomales (ligero aumento de 4,7 nm para L5B y pequeño decremento de 3,3 nm para L2A) con la excepción de LLS, que incrementó su tamaño medio hasta 143,5 nm (aumentando así en 11,1 nm). De esta forma, LLS siguieron siendo los liposomas de mayor tamaño (143,5 nm), L5A y L5Ang los más pequeños (86,9 nm y 73,9 nm, respectivamente) y L2A (105,2 nm), L2B (102,8 nm) y L5B (106,6 nm) los de tamaños intermedios.

El índice de polidispersidad se mantuvo muy estable ($p > 0,05$) tras 3 semanas de conservación, salvo para LLS que disminuyó ligeramente a partir de la segunda semana y para L5Ang que lo hizo a partir de la primera semana.

El potencial zeta varió significativamente en la mayoría de dispersiones reduciéndose su electronegatividad, aunque todas siguieron estando por debajo del límite de -30 mV, por lo que continuaron siendo partículas muy estables. La excepción fueron los liposomas L5A y L5Ang, que no vieron modificado su potencial zeta con el tiempo ($p > 0,05$), reflejando así una mayor estabilidad que el resto. Además, estas dos dispersiones junto con los liposomas LLS fueron los que tuvieron un potencial más electronegativo a las 3 semanas, considerándose los de mayor estabilidad.

Microscopía electrónica de transmisión a temperatura criogénica

Seguidamente, se llevó a cabo un estudio morfológico de las vesículas mediante microscopía electrónica de transmisión con criofijación. En la figura 34 se muestran las imágenes de las dispersiones de lecitina de soja (LLS) y con fosfatidilcolina de cinco lavados y sonicación fuerte, tanto con glicerol como sin él (L5A y L5Ang). Únicamente se estudiaron estas tres dispersiones puesto que son aquéllas con mayor (LLS) y menor (L5A, L5Ang) tamaño medio. Además, se eligieron las dos dispersiones L5A para comprobar si la presencia de glicerol en la formulación implica, más allá del tamaño final, algún cambio significativo de morfología.

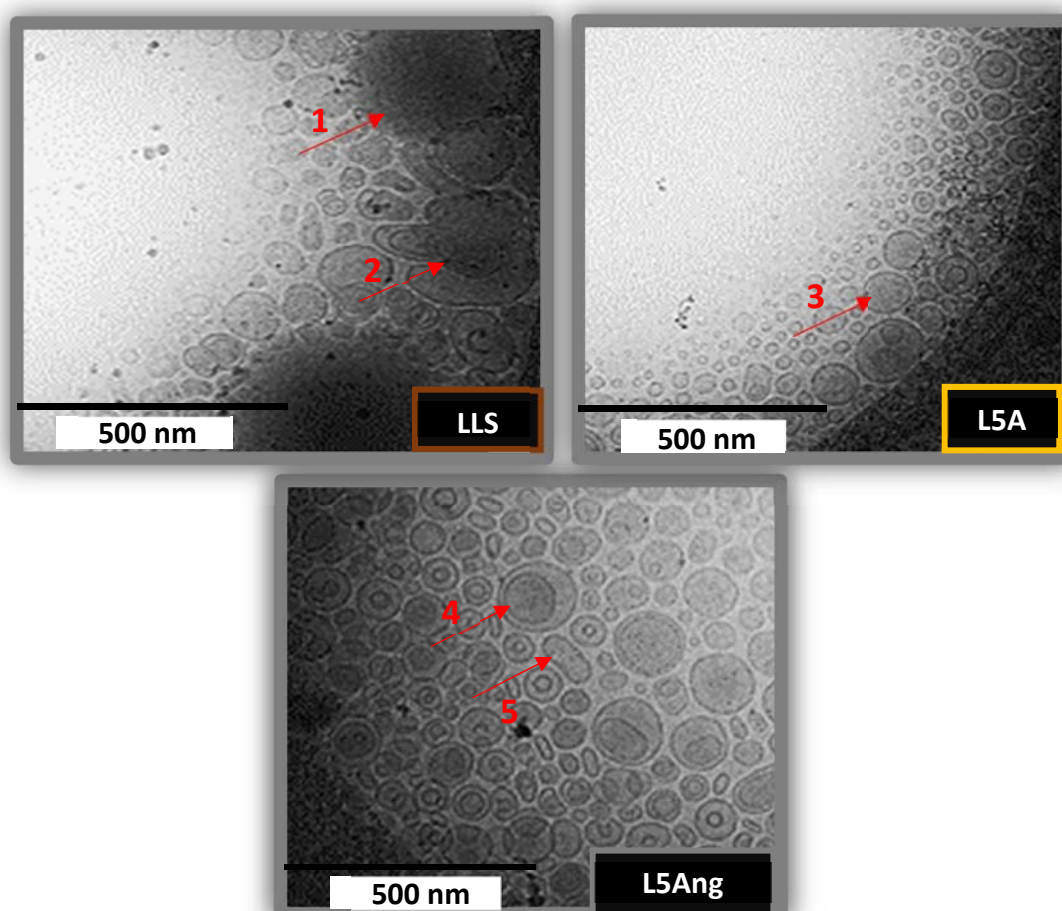


Figura 34. Fotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión por criofijación de las dispersiones liposomales (LLS, L5A, L5Ang). 1: vesículas de gran tamaño, 2: vesículas de gran tamaño irregulares, 3: vesículas pequeñas, 4: vesículas invaginadas, 5: vesículas aplanadas.

Como era de esperar, los liposomas de lecitina presentaron una morfología y distribución de tamaños más heterogénea con una importante cantidad de vesículas de gran tamaño y forma irregular, lo que confirma su mayor tamaño medio (132,4 nm) medido por dispersión dinámica de luz. Estas peculiaridades observadas por microscopía las describieron previamente Rangelov et al. (2010), atribuyéndose a la presencia de impurezas y al alto grado de insaturación de la lecitina de soja. En cambio, los liposomas L5A y L5Ang mostraron mayoría de vesículas unilamelares de pequeño tamaño y morfología esférica bastante homogénea, lo que encaja con su pequeño tamaño determinado por dispersión dinámica de luz (87,4 nm L5A y 74,3 nm L5Ang).

Los liposomas L5A mostraron su morfología mayormente esférica mientras que en los liposomas L5Ang se atisban algunas vesículas de forma aplanada así como mayor número de invaginaciones, lo que explicaría su ligero mayor índice de polidispersidad (0,266) respecto al resto de dispersiones. El glicerol, por lo tanto, podría proteger la estructura de los liposomas frente a cambios físicos y mantener una morfología esférica más uniforme.

Calorimetría Diferencial de Barrido

Varias transiciones de fase endotérmicas (con absorción de calor) se observaron por Calorimetría Diferencial de Barrido para cada dispersión liposomal (Figura 35). La primera transición observada (Figura 35A) tuvo lugar a temperaturas sub-zero (temperaturas negativas) oscilando en un rango de -1,7 a -8,9 °C (Tabla 5). Este primer cambio de fase (T_1 , ΔH_1) se correlaciona claramente con la fusión del agua extra-liposomal, es decir, el agua presente en la dispersión y no confinada en las membranas (intra-liposomal), la cual tiene lugar a temperaturas

cercanas a 0 °C (Lefèvre et al., 2002) y es típica de muestras en estado acuoso, como es el caso de nuestras dispersiones liposomales concentradas. Por tanto, esta primera transición de fase hace referencia a la interacción entre las moléculas de agua extra-liposomales y las propias vesículas.

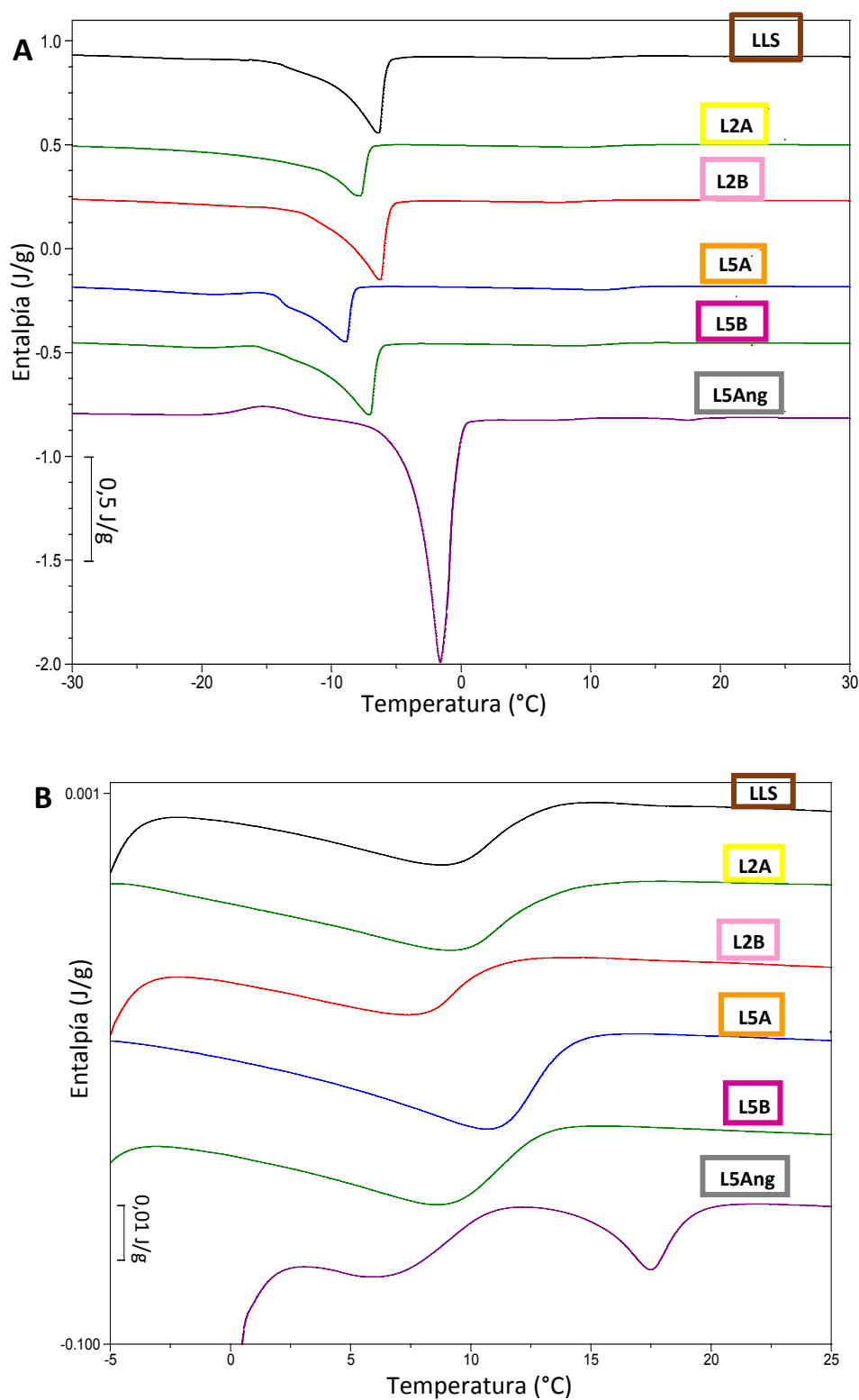


Figura 35. Termogramas reflejando las transiciones de fase mediante Calorimetría Diferencial de Barrido de las dispersiones liposomales (LLS, L2A, L2B, L5A, L5B, L5Ang). A) Primera transición. B) Segunda transición.

Para las dispersiones conteniendo glicerol, al comparar entre dos y cinco lavados con igual método de sonicación se observa que la T_1 es menor para las muestras de cinco lavados (L5A y L5B) y, por tanto, de mayor concentración de fosfatidilcolina, coincidiendo con los resultados previos de Calorimetría Diferencial de Barrido para las fosfatidilcolinas parcialmente purificadas (Figura 31). Por otro lado, si comparamos entre métodos de sonicación fuerte y débil para un mismo grado de purificación observamos que T_1 es menor para las muestras con el método de sonicación A (fuerte). Este resultado podría indicar que una sonicación más fuerte da lugar a una mayor cantidad de vesículas unilamelares pequeñas, tal y como demostró previamente Taylor & Morris (1995). Por tanto, la dispersión L5A (mayor grado de purificación y sonicación más fuerte) fue la que tuvo la menor T_1 ($p \leq 0,05$) con un valor de $-8,9$ °C, asociada a su mayor concentración de fosfatidilcolina y a su mayor prevalencia de vesículas unilamelares pequeñas. Además, fue la dispersión que presentó una menor entalpía (ΔH_1) para esta primera transición, con un valor significativamente menor que el resto ($48,1$ J/g), lo que, según Biltonen & Lichtenberg (1993), podría indicar una menor prevalencia de vesículas unilamelares grandes, lo que concordaría con las observaciones anteriores.

Por su parte, mientras que todas las dispersiones con glicerol (incluida LLS) presentaron valores de temperatura y entalpía relativamente parecidos (destacando L5A), la dispersión L5Ang (sin glicerol) mostró valores más alejados, con una T_1 de $-1,7$ °C y ΔH_1 de $106,2$ J/g, indicando que L5Ang es la muestra con el valor más cercano a los 0 °C de fusión del agua. La adición de glicerol en la dispersión liposomal cambia los parámetros T_1 y ΔH_1 con respecto a la muestra L5Ang, a través de la modificación en la interacción de las moléculas de agua con la superficie de membrana de las vesículas, reflejando que el glicerol altera la estructura de la membrana lipídica.

Tabla 5. Temperatura (T , °C) y entalpía (ΔH , J/g) de las transiciones de fase observadas por Calorimetría Diferencial de Barrido de las dispersiones liposomales (LLS, L2A, L2B, L5A, L5B, L5Ang). Diferentes letras (a, b, c, d, e) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre liposomas.

| | T_{pico1} (°C) | ΔH_{pico1} (J/g) | T_{pico2} (°C) | ΔH_{pico2} (J/g) |
|-------|-------------------------|---------------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| LLS | $-6,3 \pm 0,3^b$ | $76,2 \pm 3,8^c$ | $9,0 \pm 0,5^{ab}$ | $4,4 \pm 0,8^{bc}$ |
| L2A | $-7,8 \pm 0,3^d$ | $72,7 \pm 2,2^b$ | $9,2 \pm 0,4^b$ | $6,8 \pm 1,0^c$ |
| L2B | $-6,2 \pm 0,2^b$ | $67,5 \pm 4,1^b$ | $7,9 \pm 0,3^a$ | $3,2 \pm 0,3^b$ |
| L5A | $-8,9 \pm 0,3^e$ | $48,1 \pm 1,9^a$ | $11,3 \pm 0,5^c$ | $8,3 \pm 0,7^d$ |
| L5B | $-7,0 \pm 0,2^c$ | $74,2 \pm 2,4^{bc}$ | $9,0 \pm 0,4^{ab}$ | $5,0 \pm 1,0^{bc}$ |
| L5Ang | $-1,7 \pm 0,1^a$ | $106,2 \pm 6,4^d$ | $8,4 \pm 0,5^{ab}$ | $2,2 \pm 0,1^a$ |

La segunda transición de fase (Figura 35B) tuvo lugar a valores positivos de temperatura ($7,9$ - $11,3$ °C) y con menores valores de entalpía ($2,20$ - $8,34$ J/g) (Tabla 5). Esta transición se trata en realidad de una pretransición (T_2) y refleja el ordenamiento y estructuración de la membrana a través de la interacción entre las cabezas polares de los fosfolípidos de membrana (Yokota et al., 2012). Es un pico muy característico que siempre está presente en este tipo de vesículas, salvo en los casos en los que la formulación incluye colesterol o un derivado del mismo, el cual puede hacer desaparecer esta pretransición (Manca et al., 2017). La dispersión L5A (más purificada y con mayor sonicación) destacó nuevamente, esta vez por ser la que presentó una mayor T_2 ($11,3$ °C) así como mayor ΔH_2 ($8,3$ J/g) ($p \leq 0,05$ para ambos parámetros), indicando que se trata de una matriz vesicular de mayor rigidez que el resto, lo que la hace menos susceptible de movilidad molecular (Yokota et al., 2012), mostrando de este modo una mayor estabilidad y un mejor ordenamiento de membrana (Christensen et al., 2007). El resto de dispersiones

presentaron valores inferiores tanto para temperatura como entalpía. En función del grado de purificación, las dispersiones con FC5 tuvieron mayores valores de T_2 y ΔH_2 que aquellas con FC2 con una misma sonicación, indicando un mayor ordenamiento de membrana. En cuanto al tipo de sonicación con un mismo tipo de fosfatidilcolina, las sometidas a sonicación fuerte (A) mostraron valores mayores de T_2 y ΔH_2 frente a las de sonicación más leve (B). Por tanto, coincide que la dispersión con FC5 y sonicación A (L5A) sea la más estable y ordenada. Por otro lado, se observaron valores intermedios para la dispersión de lecitina de soja (LLS) mientras que L5Ang mostró el menor valor de entalpía (2,20 J/g) y el segundo menor valor de temperatura (8,4 °C), demostrando un comportamiento térmico diferente a la dispersión análoga con glicerol añadido.

Finalmente, la transición de fase típica de los sistemas liposomales (T_3 y ΔH_3) se trata de una transición endotérmica desde una fase gel hasta una fase líquido-cristalina y tiene lugar como resultado de una reducción en la fuerza de las interacciones de Van der Waals, provocando un aumento de la movilidad de las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana (Pennington et al., 2016).

Esta transición solo fue visible en L5Ang, con valores de 17,3 °C y 0,95 J/g para T_3 y ΔH_3 , respectivamente. No se observó dicha transición para ninguna de las dispersiones incorporando glicerol en su formulación, independientemente de la materia prima empleada o del método de sonicación inducido. Yokota et al. (2012) obtuvieron similares resultados al incorporar un crioprotector en liposomas elaborados a partir de lecitina de soja no purificada (desaparece la transición por completo), al igual que Manca et al. (2017) al estudiar las transiciones de fase de liposomas con glicerol incorporado (observó una notable disminución de T_3). Esta disminución o incluso desaparición de la transición de fase principal se debió claramente y como acusaron dichos autores a la presencia del crioprotector en la formulación liposomal. Según describió previamente Pennington et al. (2016), el crioprotector (glicerol en nuestro caso) reemplaza las moléculas de agua de la membrana (tanto en el interior de la bicapa como en la superficie), rompiendo los puentes de hidrógeno de las moléculas de agua presentes y formando nuevos enlaces con las cabezas polares de los fosfolípidos. De este modo, modifica el estado de hidratación de la membrana y provoca un efecto de fluidificación, ya que disminuye el empaquetamiento de las cadenas hidrocarbonadas aumentando la distancia entre las membranas de la bicapa. Este efecto ocasiona un menor estrés de membrana (Yokota et al., 2012) evitando su posible fusión o rotura (Pennington et al., 2016) así como una mayor estabilidad de la misma.

En la bibliografía está bien descrito que la fosfatidilcolina sintética o pura presenta su temperatura de transición de fase principal (T_m) a 41 °C (Biltonen & Lichtenberg, 1993), muy por encima de nuestros resultados. Sin embargo, estos mismos autores afirman que esta temperatura media puede variar en función de la estructura y composición del lípido. De tal modo, la presencia de insaturaciones, dobles enlaces *cis*, cadenas hidrocarbonadas laterales asimétricas, cargas iónicas o impurezas pueden reducir esta temperatura (T_m) hasta en 60 °C (incluso, según Svetlovics et al. (2012), hasta obtener valores negativos). Las insaturaciones pueden afectar también a la amplitud del pico de la transición (incrementándola) y a la entalpía asociada a dicho pico (disminuyéndola), favoreciendo el efecto de fluidificación visto anteriormente (Montenegro et al., 2006).

Liposomas liofilizados

Las dispersiones liposomales son generalmente estables por un tiempo limitado, pudiendo sufrir efectos de fusión, agregación o sedimentación (Sharma & Sharma, 1997), si su almacenamiento se prolonga en el tiempo. Por ello, se plantea la estabilización de estas dispersiones mediante procesos de secado. Una estrategia muy empleada y con excelentes resultados es la liofilización, un proceso de secado por sublimación de muestras líquidas a vacío y temperatura controlada.

Estudios previos de Porfire et al. (2017) demostraron que la liofilización ayuda a preservar la estabilidad de los liposomas evitando los efectos de agregación o sedimentación y aumentando su vida útil. Además, los liposomas liofilizados se presentan como una alternativa real en función de los requerimientos finales del producto. Por esta razón, todas las dispersiones liposomales se sometieron a liofilización y los datos que se muestran a continuación corresponden a liposomas secados mediante este proceso.

Características de partícula

Se estudiaron las características de partícula (Tabla 6) con el objetivo de evaluar si se producen cambios con el proceso de secado y cómo se comportan los liposomas una vez rehidratados.

Tabla 6. Tamaño medio (nm), índice de polidispersidad y potencial zeta (mV) de las dispersiones liposomales (LLS, L2A, L2B, L5A, L5B, L5Ang) recién preparadas y rehidratadas tras la liofilización. Diferentes letras (a, b, c, d, e, f) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre liposomas para un mismo estado físico, y (x, y) en la misma fila indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre diferentes estados físicos para una misma formulación liposomal.

| | | Dispersiones | Liofilizados |
|---------------------|-------|--------------------------|-------------------------|
| Tamaño (nm) | LLS | $132,4 \pm 0,6^{e/x}$ | $987,0 \pm 28,1^{d/y}$ |
| | L2A | $108,5 \pm 0,4^{d/x}$ | $247,7 \pm 13,9^{a/y}$ |
| | L2B | $102,1 \pm 0,5^{c/x}$ | $268,3 \pm 3,5^{a/y}$ |
| | L5A | $87,4 \pm 0,8^{b/x}$ | $316,6 \pm 6,7^{b/y}$ |
| | L5B | $101,9 \pm 0,5^{c/x}$ | $303,4 \pm 2,0^{b/y}$ |
| | L5Ang | $74,3 \pm 0,3^{a/x}$ | $482,6 \pm 6,2^{c/y}$ |
| Polidispersidad | LLS | $0,222 \pm 0,007^{ab/x}$ | $0,577 \pm 0,026^{b/y}$ |
| | L2A | $0,171 \pm 0,013^{a/x}$ | $0,421 \pm 0,033^{a/y}$ |
| | L2B | $0,235 \pm 0,016^{b/x}$ | $0,468 \pm 0,028^{a/y}$ |
| | L5A | $0,240 \pm 0,005^{bc/x}$ | $0,374 \pm 0,081^{a/x}$ |
| | L5B | $0,244 \pm 0,008^{bc/x}$ | $0,371 \pm 0,030^{a/y}$ |
| | L5Ang | $0,266 \pm 0,009^{c/x}$ | $0,393 \pm 0,040^{a/y}$ |
| Potencial zeta (mV) | LLS | $-44,3 \pm 0,2^{b/x}$ | $-46,3 \pm 0,5^{a/x}$ |
| | L2A | $-44,3 \pm 4,5^{b/x}$ | $-51,7 \pm 1,2^{ab/x}$ |
| | L2B | $-41,5 \pm 2,8^{b/x}$ | $-51,5 \pm 2,3^{ab/y}$ |
| | L5A | $-35,5 \pm 1,7^{a/x}$ | $-54,2 \pm 1,5^{b/y}$ |
| | L5B | $-42,1 \pm 1,3^{b/x}$ | $-55,9 \pm 2,4^{b/y}$ |
| | L5Ang | $-34,5 \pm 1,9^{a/x}$ | $-46,9 \pm 3,6^{a/y}$ |

Tanto el tamaño medio como el índice de polidispersidad de todas las dispersiones liposomales aumentaron muy notablemente ($p \leq 0,05$) tras el proceso de liofilización. Este efecto ya lo observaron Chen et al. (2010), quienes atribuyeron este aumento de tamaño e índice de polidispersidad a fenómenos de fusión y/o agregación ocasionados por la eliminación del agua contenida en la muestra durante el proceso de secado. El tamaño final de los liposomas viene determinado por multitud de factores, como son el método y condiciones de elaboración, la composición y proporciones de lípidos empleados en la formulación, la adición y tipos de crioprotectores, etc. (Liu et al., 2010). Además, Rasouljanboroujeni et al. (2017) demostraron que las propias condiciones establecidas en el proceso de liofilización pueden condicionar el tamaño medio final de los liposomas. Aun así, hay que mencionar que el tamaño medio de los liposomas sometidos a liofilización, aunque significativamente superior al de las dispersiones frescas, puede seguir considerándose dentro de un rango nanométrico.

En contraposición, el potencial zeta disminuyó (se volvió más electronegativo) con la liofilización en todos los liposomas reflejando así una mayor estabilidad de membrana de las vesículas resuspendidas, tal y como describió Porfire et al. (2017). Además, como se comentó anteriormente, los liposomas liofilizados podrían funcionar como una preparación alternativa factible puesto que tienen un reducido contenido en agua, lo que aumenta su estabilidad en el tiempo y versatilidad de uso.

La tabla 6 muestra las propiedades de partícula de los liposomas rehidratados. Los liposomas de lecitina de soja (LLS) presentaron un mayor tamaño ($p \leq 0,05$), con un promedio de 987,0 nm, valor muy por encima de cualquier otra preparación. Además, fueron los que más variación sufrieron tras la liofilización y, por tanto, los más inestables. En cuanto a los liposomas de fosfatidilcolina parcialmente purificada, aquellos elaborados a partir de FC2 obtuvieron un tamaño menor (247,7 nm para L2A y 268,3 nm para L2B) que los más purificados, de FC5, con un rango de tamaño de 303,4-482,6 nm. Sin embargo, no se encontró ninguna relación directa en función del método de sonicación. Comparando entre suspensiones L5, podemos apreciar que L5Ang (sin glicerol) mostró un tamaño significativamente mayor (482,6 nm) que sus equivalentes con glicerol (316,6 nm para L5A y 303,4 nm para L5B). Esta diferencia se debió a que el glicerol ejerce algún tipo de protección sobre los liposomas, impidiendo que su tamaño aumente demasiado.

Todos los liposomas liofilizados presentaron una distribución de tamaños bimodal (Figura 36) con dos poblaciones definidas y diferenciadas. Los valores del índice de polidispersidad, que también aumentaron tras la liofilización, fueron mayores ($p \leq 0,05$) para el LLS (0,577) mientras que no presentaron diferencias significativas entre el resto de liposomas. Aun así, hubo diferencias apreciables entre L2A y L2B (con valores de 0,421 y 0,468, respectivamente) y el grupo conformado por L5A, L5B y L5Ang con un rango de polidispersidad de 0,371-0,393.

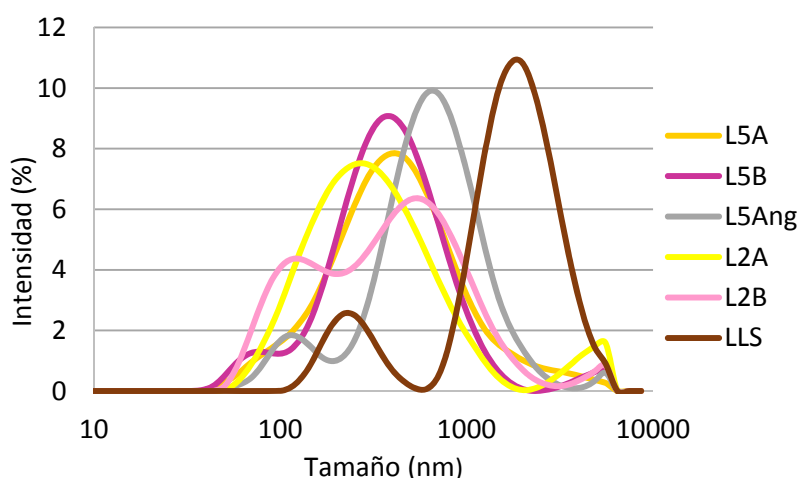


Figura 36. Distribución de tamaños de partícula de los liposomas liofilizados (L5A, L5B, L5Ang, L2A, L2B, LLS).

Por otro lado, el potencial zeta mostró los valores más electronegativos (mayor estabilidad de partícula) para los liposomas L5A y L5B (-54,2 y -55,9 mV, respectivamente) mientras que LLS con -46,3 mV y L5Ang con -46,9 mV fueron los de menor estabilidad, con potenciales intermedios para L2A y L2B. La menor estabilidad de LLS era esperable dado su mayor índice de polidispersidad y tamaño, así como su mayor incremento respecto al resto de liposomas tras el proceso de secado. Por su parte, la menor electronegatividad de los liposomas L5Ang se atribuyó nuevamente a la ausencia del glicerol. Esta característica junto con el mayor tamaño por parte de L5Ang parece demostrar que la presencia de un crioprotector en la formulación es necesaria

si la muestra va a ser sometida a procesos de congelación y posterior secado mediante liofilización. Yang et al. (2013) observaron previamente estas mismas conclusiones, defendiendo que los crioprotectores protegen los liposomas frente a la liofilización. De hecho, Stark et al. (2010) afirmaron que el glicerol (crioprotector empleado en nuestras formulaciones) previene los daños en las vesículas inducidos por el proceso de congelación-liofilización, evitando así efectos de fusión, agregación o degradación. En definitiva, exceptuando los liofilizados LLS y L5Ang, el resto de liposomas mostraron un tamaño relativamente nanométrico (superior al de las dispersiones) y una gran estabilidad de membrana. Dadas las diferentes propiedades de los liposomas LLS respecto a aquellos elaborados a partir de fosfatidilcolinas parcialmente purificadas, los liposomas de lecitina de soja se descartaron de futuros ensayos.

Microscopía electrónica de transmisión a temperatura criogénica

Los resultados obtenidos por dispersión dinámica de luz de los liposomas liofilizados se contrastaron con imágenes de microscopía electrónica de transmisión por criofijación. En este caso se analizaron únicamente los liposomas L5A por la misma razón que con las dispersiones, solo se quiere verificar cualitativamente y a grandes rasgos si el proceso de liofilización afecta a la morfología o tamaño de los liposomas, sin comparación entre ellos. La técnica no permite la visualización de muestras en estado sólido, por lo que se resuspendió la preparación en buffer fosfato pH 7 (buffer de preparación de liposomas) para tener una muestra líquida medible pero a su vez muy concentrada (30 mg/mL), adquiriendo finalmente un aspecto viscoso.

La imagen microscópica de L5A (Figura 37) mostró una morfología claramente esférica, distinguiéndose dos poblaciones por su tamaño, una mayoritaria de pequeño tamaño y otra minoritaria de gran tamaño y de naturaleza multivesicular (coincidiendo con los datos observados en la gráfica de distribución de tamaños). Asimismo, se aprecia un aumento en el número de vesículas bi- o multilamelares con respecto a la dispersión liposomal fresca.

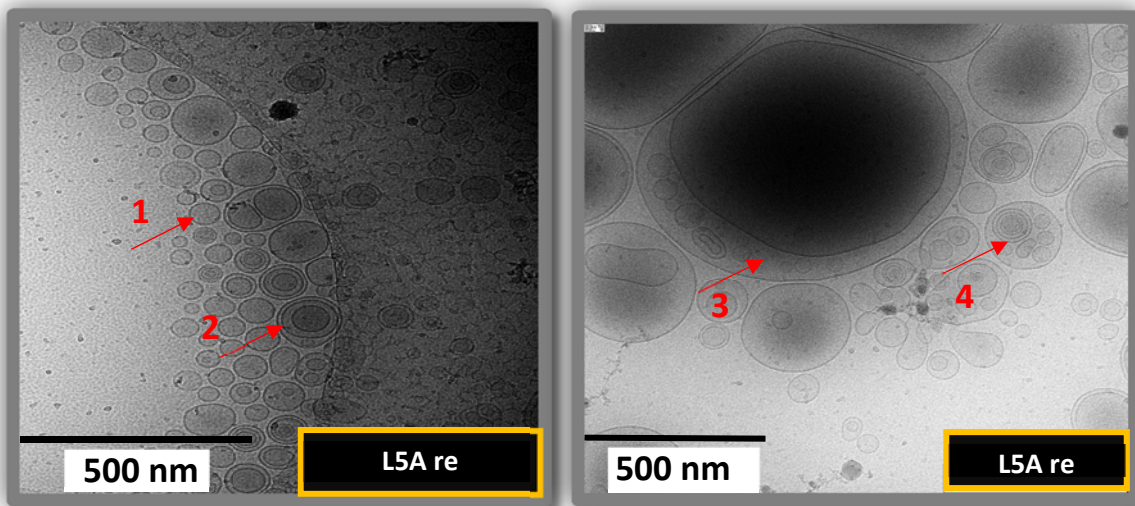


Figura 37. Fotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión por criofijación de los liposomas liofilizados y posteriormente resuspendidos (L5A). 1: vesículas pequeñas, 2: vesículas multilamelares, 3: vesículas grandes, 4: estructuras multivesiculares.

Color

Aunque como dispersiones no se observaron diferencias visuales, como liofilizados (producto deshidratado) sí son evidentes. Los liposomas liofilizados con glicerol presentaron un color marrón/ocre y una consistencia gomosa semejante a un chicle, por lo que se consideraron como pastas liofilizadas. Por otro lado, los liposomas sin glicerol (L5Ang) dieron lugar a un polvo granulado de color amarillo-blancuecino tras el proceso de liofilización (Figura 38). Como ya se

explicó en apartados anteriores, el glicerol parece interferir en la estructura de la bicapa lipídica, probablemente dificultando el proceso de secado, lo que explicaría las diferencias en el aspecto de los liposomas después de liofilizarlos.



Figura 38. Aspecto visual de los liposomas liofilizados. Izquierda: L5A; Derecha: L5Ang.

Estas diferencias visuales se observaron también mediante evaluación instrumental del color, cuyos parámetros de cromaticidad (saturación) y tonalidad se representan en la figura 39. Estos índices se obtuvieron a partir de los datos primarios del sistema CIELab: L^* (luminosidad), a^* (intervalo rojo-verde) y b^* (intervalo amarillo-azul) tal y como se indica en materiales y métodos.

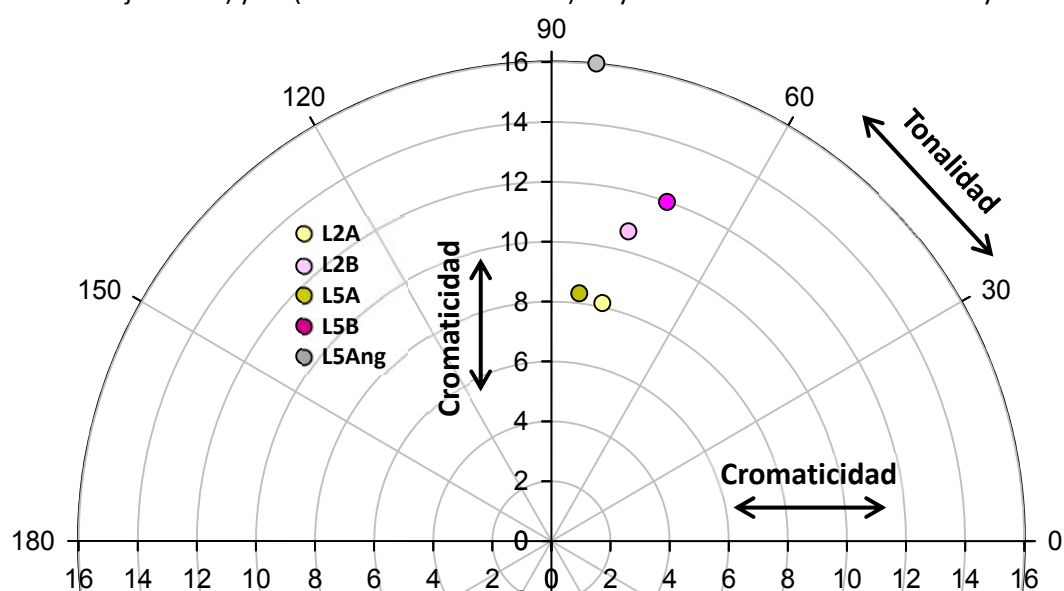


Figura 39. Gráfico reflejando los parámetros de color cromaticidad y tonalidad de los liposomas liofilizados (L2A, L2B, L5A, L5B, L5Ang).

Todos los liposomas se mantuvieron en un estrecho rango de tonalidad, con valores entre 70,9-84,5, siendo L5A y L5Ang los de mayor valor pero sin diferencias entre ellos. Aunque la consistencia es totalmente diferente, sí es cierto que el color (ya sea en forma de polvo o de pasta) fue de un tono amarillento y por esta razón no hubo diferencias significativas con los liposomas L5Ang.

Sin embargo, el parámetro cromaticidad sí que presentó importantes diferencias entre L5Ang y los liposomas con glicerol, dado que la saturación (intensidad) del color fue muy diferente. De este modo, L5Ang tuvo mayor cromaticidad (intensidad más clara o brillante) que el resto de liposomas, los cuales presentaron un valor inferior y parecido entre ellos. Aun así se pueden apreciar ligeras diferencias: los liposomas elaborados a partir de fosfatidilcolina más purificada (L5A y L5B) tuvieron una menor cromaticidad que los de menos purificada (L2A y L2B). Sin embargo, no se observaron diferencias en ningún parámetro en función del método de sonicación. Los resultados de luminosidad o L^* (no mostrados aquí) reflejan un mayor valor para

L5Ang (≈ 83) respecto al resto de liposomas (≈ 33) corroborando su mayor luminosidad, es decir, su coloración más clara, dentro un mismo rango de color, respecto a los demás liposomas.

Contenido en agua

En la tabla 7 se muestran los resultados de contenido en agua residual de las muestras desecadas. Los liposomas secos L5Ang presentaron un contenido en agua residual del 2,7 %, valor muy apropiado, dado que se trata de un polvo liofilizado. Con este proceso se elimina la mayor parte del agua contenida en la muestra, sin embargo, siempre queda un mínimo porcentaje de agua remanente, procedente de moléculas de agua que forman fuertes enlaces con otros compuestos y quedan englobadas o asociadas a los liposomas.

En cambio, los liposomas secos con glicerol presentaron un rango de contenido en agua entre 13,9-18,5 % (sin relación en función del material encapsulante o del método de sonicación), valores a priori muy elevados para tratarse de muestras que han sido sometidas a un proceso de liofilización. La diferencia, tanto en la consistencia y apariencia, como en contenido en agua residual, se debe claramente al glicerol, el cual interfiere con las membranas de la bicapa lipídica y aumenta considerablemente el estado de hidratación de los liposomas (Manca et al., 2013), provocando una fluidificación de las preparaciones resultantes, en concordancia con los resultados previos de Calorimetría Diferencial de Barrido.

Tabla 7. Contenido de agua (%) y capacidad de dispersión en agua (%) de liposomas liofilizados (L2A, L2B, L5A, L5B, L5Ang). Diferentes letras (a, b, c) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre liposomas.

| | Contenido en agua (%) | Capacidad de dispersión (%) |
|-------|-----------------------|-----------------------------|
| L2A | $17,5 \pm 3,5^a$ | $70,0 \pm 1,0^b$ |
| L2B | $18,5 \pm 5,2^a$ | $64,4 \pm 0,0^a$ |
| L5A | $18,5 \pm 2,2^a$ | $72,3 \pm 1,6^b$ |
| L5B | $13,9 \pm 2,0^a$ | $71,4 \pm 0,7^b$ |
| L5Ang | $2,7 \pm 0,6^b$ | $98,1 \pm 0,0^c$ |

Dispersabilidad en agua

La dispersabilidad en agua (Tabla 7) fue muy similar en los liposomas con glicerol, mostrando valores comprendidos entre 64,4 y 72,3 %, sin diferencias significativas entre ellos. Los liposomas sin glicerol (L5Ang) presentaron una dispersabilidad casi completa (98,1 %), probablemente debido a que su estado físico en forma de polvo permite una mejor resuspensión en agua. Aun así hay que tener en cuenta que en esta técnica se forzó su precipitación mediante centrifugación. Los resultados de esta técnica reflejan los efectos tras una manipulación invasiva sobre los liposomas o tras el paso del tiempo, permitiendo una comparativa de su capacidad de dispersión en las condiciones estudiadas. En todos los casos, los liposomas se dispersaron aparentemente en su totalidad, sin precipitación espontánea.

Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier

La Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier mostró un primer pico de absorción característico entre $1042-1052 \text{ cm}^{-1}$ (Figura 40A), correspondiente a los grupos colina $(\text{CH}_3)_3\text{-N}^+$ situados en las cabezas polares de los fosfolípidos de membrana. Este pico disminuyó considerablemente su absorbancia en las formulaciones que incorporaban glicerol con respecto a los liposomas L5Ang, indicando que la presencia de glicerol induce una alteración en la conformación de las cabezas de colina posiblemente debida a una disminución del número de moléculas de agua (enlaces dipolo) que unen los grupos fosfato adyacentes (Nogueira et al., 2018). No se encontró ninguna relación para la disminución del grupo $(\text{CH}_3)_3\text{-N}^+$ en función de la

purificación de fosfolípidos (número de lavados) o del método de sonicación, así como para el resto de frecuencias estudiadas. Por esta razón, nos centraremos en la influencia del glicerol en la estructura de los liposomas, comparando los liposomas sin glicerol (L5Ang) con aquéllos que sí lo llevan (L2A, L2B, L5A y L5B).

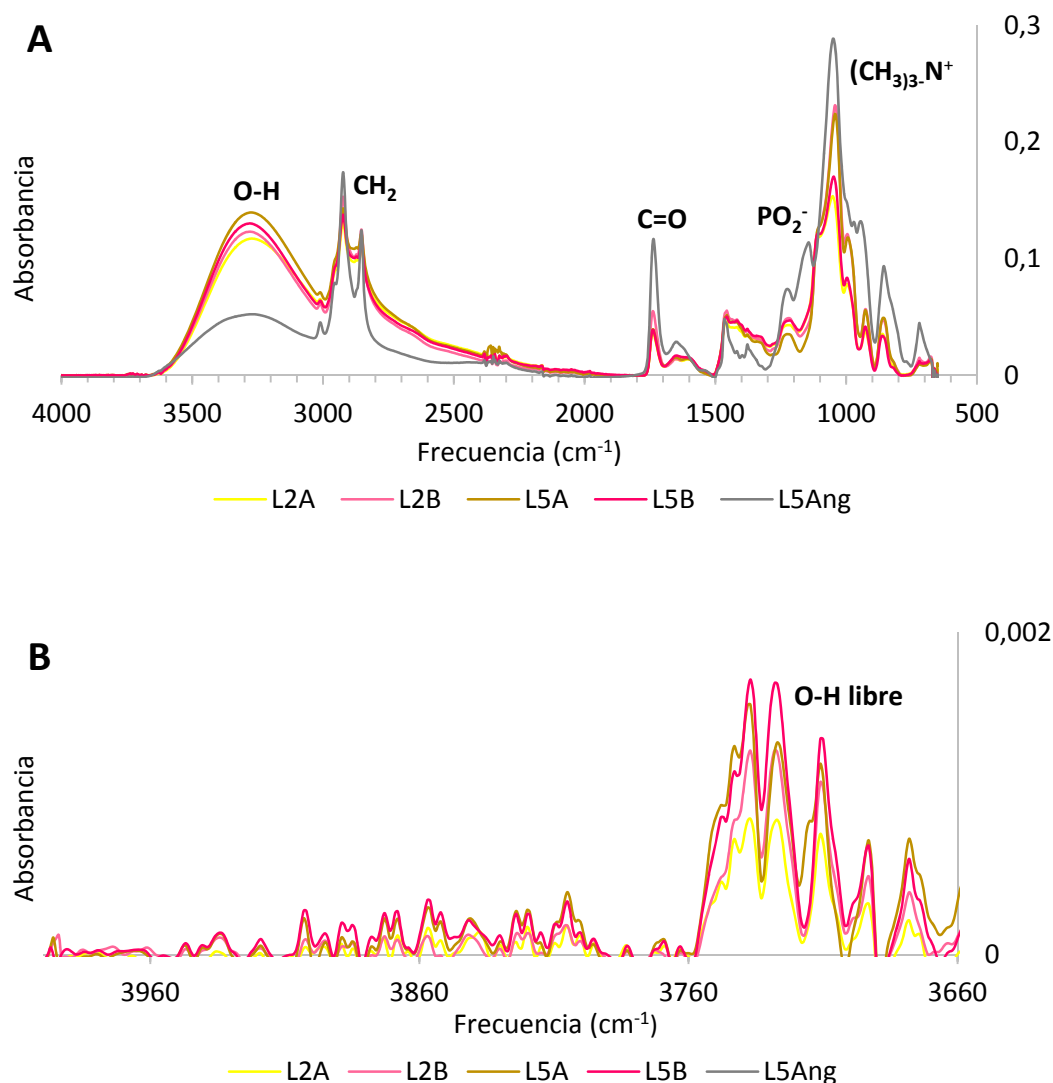


Figura 40. Espectros de Infrarrojo con Transformada de Fourier de los liposomas liofilizados (L2A, L2B, L5A, L5B, L5Ang). A) 4000-500 cm^{-1} . B) 4000-3660 cm^{-1} .

El siguiente pico característico fue localizado entre 1215-1227 cm^{-1} , correspondiente a los grupos fosfato PO_2^- de las cabezas polares. Nuevamente los liposomas L5Ang presentaron una mayor absorbancia que los liposomas con glicerol para este rango de frecuencias, debido a que el glicerol interacciona con los grupos fosfato de las cabezas vecinas, rompiendo parte de los puentes de hidrógeno que las mantienen unidas (Tai et al., 2017; Chiou et al., 1992), cambiando su estructura.

Otro pico de absorción característico fue el localizado entre 1737-1740 cm^{-1} , relacionado con la vibración de los grupos carbonilo C=O de los ácidos grasos. La intensidad de dicho pico fue igualmente muy superior para los liposomas sin glicerol respecto a los que sí lo tienen incorporado. Este resultado refleja que el glicerol interfiere en los grupos carbonilo situados en la región interfacial polar/apolar, provocando cambios en la hidratación y en el número o fuerza de las interacciones por puentes de hidrógeno con dichos grupos (Mannock et al., 2010).

Los siguientes picos destacables fueron los correspondientes a las vibraciones simétricas y asimétricas de los grupos CH_2 de las cadenas laterales ($2853\text{-}2854\text{ cm}^{-1}$ y $2923\text{-}2924\text{ cm}^{-1}$, respectivamente). Ambos picos fueron ligeramente superiores para los liposomas L5Ang respecto al resto, excepto los liposomas L2B que presentaron valores similares a los liposomas sin glicerol. Esta mayor detección de señal de los grupos CH_2 indica que los liposomas L5Ang tuvieron una mayor movilidad de sus cadenas hidrocarbonadas en el interior de la bicapa (Nogueira et al., 2018) así como un posible mayor desorden de membrana (Mannock et al., 2010). Por lo tanto, la adición de glicerol produce una conformación estructural diferente, ya que modifica la configuración de los puentes de hidrógeno a distintos niveles de la bicapa dando lugar a una estructura más estable y ordenada.

Con respecto a la absorción en el espectro infrarrojo debida a la vibración del grupo O-H (relacionado con las moléculas de agua), se distinguen dos subgrupos o frecuencias, de acuerdo a Chiou et al. (1992): los grupos O-H que reflejan el agua libre ($3678\text{-}3740\text{ cm}^{-1}$) y los grupos O-H que reflejan el agua unida a la membrana ($3272\text{-}3280\text{ cm}^{-1}$). El agua libre procede de la rotura de los puentes de hidrógeno que unen las moléculas de agua. En nuestro estudio podemos ver (Figura 40B) cómo esta banda presenta mayor intensidad de absorbancia en los espectros de absorción de infrarrojo (FTIR) de los liposomas con glicerol, confirmando lo que veíamos antes, que el glicerol rompe los enlaces por puente de hidrógeno liberando parte del agua que es detectada como agua libre. Los liposomas sin glicerol (L5Ang) son menos susceptibles de sufrir estas modificaciones y por tanto su contenido de agua libre es menor (2,7 %). Por otra parte, todos los liposomas presentaron la banda correspondiente al agua unida a la membrana (Figura 40B), siendo ésta mayor para los liposomas con glicerol. Esta mayor absorbancia para este rango de frecuencias indica que existe más agua unida a la membrana por puentes de hidrógeno para los liposomas con glicerol (Pawlikowska-Pawlega et al., 2018). Esto se debe a que el glicerol reemplaza a las moléculas de agua y forman enlaces por puentes de hidrógeno con la propia membrana, incrementando así los grupos O-H unidos a la membrana (adicionales a los grupos O-H que aporta el propio glicerol).

Conclusiones

Se confirma que la acetona es un solvente adecuado para la concentración de la fracción de fosfolípidos presentes en la lecitina de soja. También se demuestra que el incremento del número de lavados con acetona contribuye a una reducción progresiva del contenido de lípidos neutros, ácidos grasos libres y tocoferoles. Sin embargo, no modifica el perfil de ácidos grasos de la fracción de fosfolípidos, donde predominó el ácido linoleico (C18:2n6c), representando el 59 % de esta fracción tanto para la lecitina como para las fosfatidilcolinas. Un mayor grado de purificación no mostró cambios en las clases de fosfolípidos aniónicos (fosfatidilinositol y ácido fosfatídico), sin embargo, sí lo hizo en los catiónicos, donde la fosfatidilcolina estuvo más concentrada para FC5 respecto a FC2. El estudio de Calorimetría Diferencial de Barrido evidenció esta concentración de fosfolípidos y el de Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier la posibilidad de acumulación de aldehídos y cetonas en ambas fosfatidilcolinas. Todas las dispersiones liposomales presentaron una muy elevada estabilidad y un menor tamaño de partícula respecto a la lecitina. Sin embargo, la diferencia de tamaños solo fue significativa cuando coincidió con el método de sonicación fuerte (A), es decir, en las dispersiones L5A. De cara a aplicaciones alimentarias, la fosfatidilcolina menos purificada (de dos lavados, FC2), podría ser suficiente para obtener liposomas con propiedades estructurales adecuadas. Además, su mayor contenido en tocoferoles podría proporcionar mejor protección frente a la oxidación. La producción de liposomas con glicerol causó interferencia en la membrana incrementando su tamaño de partícula pero sin modificar su carga de superficie de membrana.

**CAPÍTULO 2. ENCAPSULACIÓN DE COMPUESTOS
BIOACTIVOS MEDIANTE LIPOSOMAS DE
FOSFATIDILCOLINA DE LECITINA DE SOJA**

8.2. ENCAPSULACIÓN DE COMPUESTOS PROCEDENTES DE RESIDUOS ALIMENTARIOS EN LIPOSOMAS DE FOSFATIDILCOLINA DE SOJA: EFECTO DE LA LIOFILIZACIÓN, ESTABILIDAD DE CONSERVACIÓN Y APTITUD FUNCIONAL

Resumen

Se elaboraron liposomas de fosfatidilcolina de soja encapsulando compuestos de diferente naturaleza procedentes de residuos de la alimentación (un hidrolizado de colágeno del manto de calamar, L-HC; un extracto de piel y albedo de granada, L-PG; y un extracto de residuos de langostino, L-GC). Estas dispersiones se liofilizaron y se conservaron en congelación (-20 °C) durante 7 meses para evaluar su estabilidad. El proceso de liofilización incrementó el tamaño de partícula a la vez que disminuyó la dispersabilidad en agua de las pastas resultantes. Los liofilizados L-HC y L-PG presentaron vesículas grandes multivesiculares con morfología esférica y unilamelar. Por su parte, L-GC presentó vesículas grandes multilamelares, coincidiendo con mayores cambios estructurales en la bicapa lipídica y una mejora de la estabilidad térmica, apreciado mediante Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier y Calorimetría Diferencial de Barrido. La reología dinámica oscilatoria reveló un ligero endurecimiento de las pastas liofilizadas, inducido por el tiempo de almacenamiento. La muestra L-GC mostró un marcado incremento de rigidez en un rango de temperatura de 40-90 °C. La encapsulación de liposomas con compuestos antioxidantes previno la oxidación lipídica inducida por el proceso de liofilización. La estabilidad de los liofilizados durante la conservación y sus aptitudes tecnológicas como ingrediente alimentario variaron en función de la naturaleza química del compuesto encapsulado.

Palabras clave: liposomas, fosfatidilcolina de soja, liofilización, oxidación lipídica, estabilidad de conservación.

Introducción

Los liposomas son vesículas coloidales esféricas anfipáticas, característica que les permite atrapar y proteger tanto bioactivos lipofílicos como hidrofílicos y actuar como transportadores de éstos en el organismo (Mozafari et al., 2008). En la industria de la alimentación se emplean para enmascarar olores y sabores, así como transportadores de vitaminas, antioxidantes, proteínas, enzimas y minerales, protegiendo a los compuestos encapsulados de su interacción con los componentes de matrices alimentarias y proporcionando una mejora de estabilidad frente a la degradación química y física (Da Silva Malheiros et al., 2010).

El uso de lecitina de soja natural para la encapsulación de liposomas proporciona un importante valor nutricional atribuido a su perfil de ácidos grasos esencialmente poliinsaturados. Sin embargo, este material puede ser susceptible de sufrir oxidación lipídica. La incorporación de compuestos antioxidantes en los liposomas podría prevenir o reducir la formación de estos productos de oxidación (Frenzel & Steffen-Heins, 2015).

Existe un creciente interés en la recuperación de residuos de pescado, y una posibilidad es la hidrólisis enzimática de su componente proteico para la obtención de péptidos con diversas propiedades bioactivas. Las tónicas del calamar gigante son una excelente fuente de péptidos antioxidantes (procedentes de colágeno) que protegen a las células frente al daño oxidativo (Giménez et al., 2009; Mendis et al., 2005). Los elevados niveles de hidroxiprolina, residuos hidrofóbicos y péptidos glicosilados en los hidrolizados de gelatina de túnica de calamar se relacionan con una magnífica actividad antioxidante (Alemán et al., 2011; Alemán et al., 2013). Los residuos de cutículas y cefalotórax procedentes de la industria del procesamiento de crustáceos también proporcionan una fuente de compuestos bioactivos con efectos saludables. El extracto lipídico de langostino (*L. vannamei*) basado en una elevada proporción de ácidos

grasos poliinsaturados omega-3 (ácido docosahexaenoico y ácido eicosapentaenoico), astaxantina y α -tocoferol también presenta actividades antioxidantes (Gómez-Estaca et al., 2016; Gómez-Estaca et al., 2017). Entre los residuos de plantas, los extractos de piel de granada, ricos en polifenoles como elagitaninos, ácido elágico y antocianinas, son conocidos por sus efectos beneficiosos basados en sus actividades antioxidantes y antiproliferativa (Masci et al., 2016).

Hay numerosa información publicada acerca de liposomas encapsulando una amplia variedad de compuestos naturales con propiedades antioxidantes, tales como gelatina o hidrolizados de colágeno (Ramezanzade et al., 2017; Mosquera et al., 2014), compuestos polifenólicos (Popova & Hinch, 2016) o compuestos lipofílicos como carotenoides (Du et al., 2015), tocoferol (Neunert et al., 2015) o ácidos grasos poliinsaturados esenciales (Semenova et al., 2016). Sin embargo, las diferencias en la composición y procedimiento de elaboración de los liposomas dificultan la comparación de sus propiedades físico-químicas.

Los liposomas son normalmente presentados como suspensiones liposomales acuosas, susceptibles de perder estabilidad, provocando fusión o agregación de vesículas, liberación del compuesto encapsulado y sedimentación (Sharma & Sharma, 1997). La liofilización es un proceso alternativo que puede aumentar la vida útil de los liposomas, manteniendo su estabilidad y preservándolos en estado seco (Stark et al., 2010). Sin embargo, la liofilización puede dañar la bicapa lipídica mediante la formación de cristales de hielo durante el proceso de congelación previo, la fusión y agregación de las vesículas, la deshidratación y posteriores cambios de transición de fase durante su rehidratación (Chen et al., 2010). Por ello, crioprotectores, tales como carbohidratos y polialcoholes, son propuestos para prevenir el daño vesicular inducido por la liofilización, siendo uno de los más empleados el glicerol (Stark et al., 2010).

Objetivos

El primer objetivo parcial de este capítulo fue el estudio del efecto de la liofilización y de la conservación a largo plazo en las propiedades físico-químicas, estructurales, reológicas, oxidativas y funcionales de liposomas con glicerol encapsulando varios compuestos bioactivos antioxidantes, procedentes de residuos de la alimentación con alto valor añadido, los cuales podrían usarse como ingredientes funcionales en alimentos.

Materiales y métodos

Inicialmente, se extrajo fosfatidilcolina parcialmente purificada tras cinco lavados en acetona (FC5) procedente de la lecitina de soja (LS). También se llevó a cabo la extracción de los diferentes extractos bioactivos a encapsular: hidrolizado de colágeno, piel y albedo de granada y grasa de crustáceo. A continuación, se elaboraron diferentes dispersiones liposomales con glicerol. Se prepararon liposomas incorporando los tres extractos bioactivos: L-HC: liposomas con hidrolizado de colágeno procedente de túnicas del manto del calamar gigante (*Dosidicus gigas*); L-PG: liposomas con extracto de piel y albedo de granada (*Punica granatum*); y L-GC: liposomas con grasa de crustáceo procedente de bioresiduos de langostino (*Litopenaeus vannamei*). Para ello, el compuesto bioactivo se incluyó a una concentración de 2 mg/mL en el primer paso del proceso, es decir, en el paso inicial de mezclar la fosfatidilcolina con el buffer fosfato. Dispersiones liposomales vacías (L-V) se estudiaron en paralelo como control.

De las dispersiones liposomales resultantes se estudiaron propiedades hidrodinámicas (tamaño de partícula, potencial Z y polidispersidad) por dispersión dinámica de luz en Zetasizer (dilución 1/10), microscopía electrónica de transmisión por criofijación (3 μ L), eficacia de encapsulación, contenido en agua y dispersabilidad en agua, propiedades térmicas por Calorimetría Diferencial

de Barrido (muestras concentradas en desecador hasta concentración final de 250 mg/mL), y estabilidad oxidativa mediante la determinación del índice tiobarbitúrico. Además, se estudió la estabilidad de las dispersiones durante 2 semanas en refrigeración (4 °C) mediante Zetasizer.

Las dispersiones liposomales se liofilizaron y se caracterizaron analizando sus propiedades hidrodinámicas mediante Zetasizer (77 mg/mL y dilución 1/10), microscopía electrónica de transmisión por criofijación (30 mg/mL), eficacia de encapsulación, contenido en agua y dispersabilidad, colorimetría, Calorimetría Diferencial de Barrido (250 mg/mL), Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier, reología (viscoelasticidad), y estabilidad oxidativa mediante el índice tiobarbitúrico. Además, se estudió la estabilidad durante 7 meses de las pastas liposomales, estableciendo controles periódicos (0, 3 y 7 meses) en congelación (-20 °C), en los cuales se caracterizaron mediante la determinación de las propiedades hidrodinámicas y físico-químicas.

Resultados y discusión

Características de partícula

Dispersión dinámica de luz en Zetasizer

Se analizaron las características de partícula de las dispersiones liposomales L-V, L-HC, L-PG y L-GC recién preparadas (Tabla 8). Todas las dispersiones liposomales encapsulantes de extractos bioactivos tuvieron un tamaño medio similar ($p > 0,05$), con tamaños de 102,3 nm para L-HC, 104,2 nm para L-PG y 102,2 nm para L-GC, los cuales son tamaños típicos de liposomas (Has et al., 2018). Otros autores obtuvieron tamaños medios parecidos o aproximados para dispersiones similares: Mosquera et al. (2016) obtuvieron liposomas de fosfatidilcolina de soja rellenos de una fracción peptídica de túnica del calamar (*Dosidicus gigas*) por ultrasonificación con un tamaño final de 110 nm; Cheng et al. (2017) elaboraron nanopartículas de epigallocatequina galato con un rango de tamaños medios de 126-167 nm; y Peng et al. (2010) desarrollaron liposomas de fosfatidilcolina conteniendo astaxantina con un tamaño de 251 nm. Las dispersiones vacías (L-V) presentaron un tamaño menor (87,4 nm) ($p \leq 0,05$) respecto a los liposomas rellenos, probablemente debido al efecto de expansión que inducen los bioactivos. Tai et al. (2017) obtuvieron similares resultados para dispersiones de liposomas de lecitina de soja vacíos, con un tamaño medio de 91,10 nm.

Todas las dispersiones mantuvieron un índice de polidispersidad comprendido entre 0,240-0,263 ($p > 0,05$). Este índice se considera aceptable para sistemas biológicos cuando es inferior a 0,3 (Füredi et al., 2016). Esta buena polidispersidad es confirmada por las gráficas de distribución de tamaños (Figura 41A), donde todas las dispersiones liposomales presentaron una distribución monomodal con una única población de tamaños definida.

Los valores de potencial zeta estuvieron comprendidos entre -35,5 mV y -43,4 mV, reflejando todas las dispersiones una excelente estabilidad de partícula, tal y como señalan Müller et al. (2001), quienes establecen una óptima estabilidad de partícula para potenciales inferiores a -30 mV. El potencial más bajo lo presentaron las dispersiones vacías, con un valor de -35,5 mV, siendo mucho más estable que el obtenido por Tai et al. (2017) para liposomas frescos (-3,4 mV). El potencial más electronegativo lo mostraron las dispersiones de hidrolizado de colágeno (L-HC) con -43,4 mV, siendo muy cercano a los -51 mV obtenidos por Mosquera et al. (2016) para liposomas frescos que contenían una fracción peptídica de gelatina de túnica de calamar. Estos resultados indican que la presencia del bioactivo favorece la estabilidad de membrana.

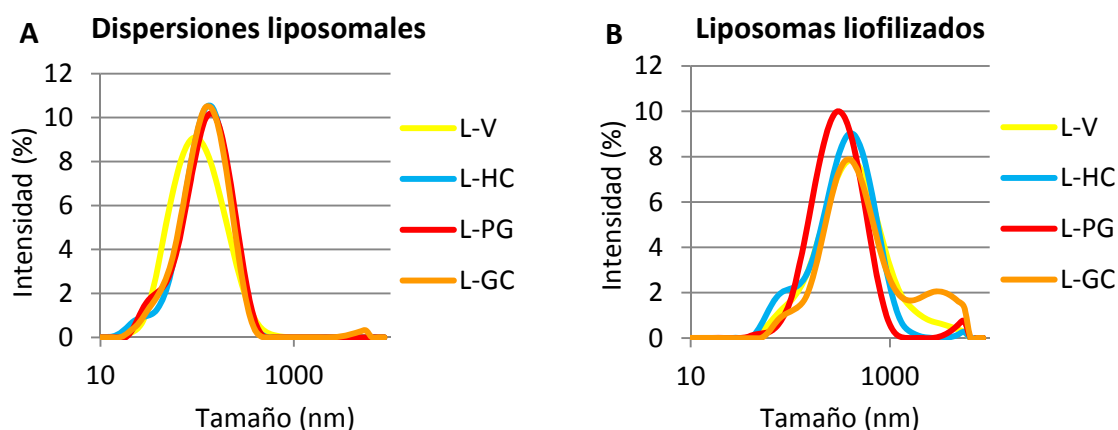


Figura 41. Distribución de tamaños de partícula de liposomas vacíos y rellenos con extractos bioactivos, donde L-V: liposomas vacíos; L-HC: liposomas con hidrolizado de colágeno; L-PG: liposomas con piel de granada; L-GC: liposomas con grasa de crustáceo.

Las cuatro dispersiones liposomales (L-V, L-HC, L-PG y L-GC) se conservaron en refrigeración a 4 °C durante 2 semanas, controlando semanalmente sus características de partícula. Tras dos semanas de conservación, tanto el tamaño medio como el índice de polidispersidad se mantuvieron estables ($p > 0,05$) para todas las dispersiones liposomales. De este modo, el tamaño medio tras dos semanas de conservación fue de 86,2 nm para L-V y del rango de 104,7-107,0 nm para las tres dispersiones con bioactivos, mientras que el índice de polidispersidad osciló en valores comprendidos entre 0,230-0,264. Dag & Oztop, (2017) extrajeron las mismas conclusiones para liposomas de lecitina de soja (70 % fosfatidilcolina) vacíos y conteniendo un extracto polifenólico de té verde comercial conservados a 4 °C durante 2 semanas.

El potencial zeta de las dispersiones de HC y GC disminuyó sus valores ($p \leq 0,05$) a la segunda semana en refrigeración (tras una semana no experimentaron cambios) hasta valores de -31,7 mV y de -32,9 mV, respectivamente. Dag & Oztop (2017) observaron que el potencial zeta disminuía, volviéndose menos electronegativo transcurridas dos semanas de conservación. Por el contrario, en el presente trabajo, las dispersiones vacías (L-V) se volvieron más electronegativas progresivamente hasta -43,7 mV, mientras que las dispersiones de piel de granada (L-PG) se mantuvieron estables en el tiempo con un valor final de -38,8 mV. Estos resultados confirman la elevada estabilidad de las dispersiones liposomales durante tiempos cortos de conservación.

Las características de partícula de los liposomas liofilizados y posteriormente rehidratados L-V, L-HC, L-PG y L-GC se muestran en la tabla 8. El proceso de liofilización incrementa el potencial electronegativo de todos los liposomas hasta valores comprendidos entre -54,2 y -59,1 mV, aumentando así la estabilidad de los liposomas. Este potencial, aunque muy parecido entre muestras, fue ligeramente más electronegativo para aquellos liposomas conteniendo extractos bioactivos, demostrando nuevamente el efecto estabilizador de los bioactivos sobre la cápsula.

Por otro lado, el tamaño medio y el índice de polidispersidad aumentaron considerablemente en todos los liposomas tras el proceso de liofilización, siendo el que contiene grasa de crustáceo (L-GC) el mayor con 372,9 nm y 0,408 de polidispersidad, y el que contiene extracto polifenólico de piel y albedo de granada (L-PG) el menor, con 256,8 nm y 0,279 de polidispersidad. Estos valores fueron corroborados por los perfiles de distribución de tamaños, mostrados en las gráficas de la figura 41B, donde los liposomas presentaron una distribución monomodal con una única población de mayor tamaño que en las dispersiones frescas, salvo en los liposomas que contenían grasa de crustáceo (L-GC) que mostraron una distribución bimodal con una segunda

población de mayor tamaño pero menor intensidad, dando lugar al elevado valor medio del índice de polidispersidad (0,408). Yang et al. (2013) obtuvieron similares resultados, observando un incremento del tamaño y la polidispersidad tras liofilizar los liposomas.

Tabla 8. Tamaño (nm), índice de polidispersidad y potencial zeta (mV) de dispersiones liposomales frescas recién preparadas y conservadas a 4 °C durante 2 semanas, y de liposomas liofilizados recién preparados y conservados a -20 °C durante 7 meses, donde L-V: liposomas vacíos; L-HC: liposomas con hidrolizado de colágeno; L-PG: liposomas con piel de granada; L-GC: liposomas con grasa de crustáceo. Diferentes letras (a, b, c, d) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre liposomas para un mismo estado físico y tiempo de conservación; (m, n, o) en la misma fila entre tiempos de conservación para una misma formulación liposomal, tanto para dispersiones como para liofilizados; (x, y) en la misma fila entre diferentes estados físicos a tiempo 0 para una misma formulación liposomal.

| Dispersiones liposomales | | Tiempo de conservación | | |
|--------------------------|------|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| | | 0 semanas | 1 semana | 2 semanas |
| Tamaño (nm) | L-V | 87,4 ± 0,8 ^{a/m/x} | 85,7 ± 0,0 ^{a/n} | 86,2 ± 0,9 ^{a/mn} |
| | L-HC | 102,3 ± 0,8 ^{b/m/x} | 104,2 ± 1,1 ^{b/n} | 104,7 ± 0,4 ^{b/n} |
| | L-PG | 104,2 ± 0,8 ^{b/m/x} | 104,0 ± 0,9 ^{b/m} | 105,5 ± 0,8 ^{b/m} |
| | L-GC | 102,2 ± 1,6 ^{b/m/x} | 105,0 ± 0,8 ^{b/mn} | 107,0 ± 1,7 ^{b/n} |
| Polidispersidad | L-V | 0,240 ± 0,005 ^{a/m/x} | 0,241 ± 0,007 ^{a/m} | 0,230 ± 0,007 ^{a/m} |
| | L-HC | 0,247 ± 0,019 ^{a/m/x} | 0,256 ± 0,007 ^{a/m} | 0,256 ± 0,006 ^{ab/m} |
| | L-PG | 0,263 ± 0,017 ^{a/m/x} | 0,263 ± 0,008 ^{a/m} | 0,264 ± 0,016 ^{b/m} |
| | L-GC | 0,246 ± 0,017 ^{a/m/x} | 0,254 ± 0,015 ^{a/m} | 0,264 ± 0,015 ^{b/m} |
| Potencial Z (mV) | L-V | -35,5 ± 1,7 ^{b/m/x} | -38,9 ± 1,1 ^{a/mn} | -43,7 ± 3,7 ^{a/n} |
| | L-HC | -43,4 ± 0,7 ^{a/m/x} | -41,5 ± 1,7 ^{a/m} | -31,7 ± 0,6 ^{c/n} |
| | L-PG | -38,2 ± 0,7 ^{b/m/x} | -40,4 ± 1,8 ^{a/m} | -38,8 ± 0,7 ^{b/m} |
| | L-GC | -41,9 ± 2,2 ^{a/m/x} | -41,2 ± 0,8 ^{a/m} | -32,9 ± 0,7 ^{c/n} |

| Liposomas liofilizados | | Tiempo de conservación | | |
|------------------------|------|---------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | 0 meses | 3 meses | 7 meses |
| Tamaño (nm) | L-V | 316,6 ± 6,7 ^{b/m/y} | 261,0 ± 3,5 ^{d/n} | 159,0 ± 2,7 ^{a/o} |
| | L-HC | 274,9 ± 5,5 ^{a/m/y} | 183,3 ± 2,0 ^{c/n} | 177,4 ± 2,6 ^{b/n} |
| | L-PG | 256,8 ± 2,3 ^{a/m/y} | 174,5 ± 3,6 ^{b/n} | 178,2 ± 2,3 ^{b/n} |
| | L-GC | 372,9 ± 15,9 ^{c/m/y} | 150,0 ± 0,6 ^{a/n} | 159,2 ± 2,4 ^{a/n} |
| Polidispersidad | L-V | 0,374 ± 0,081 ^{a/m/x} | 0,316 ± 0,035 ^{b/m} | 0,368 ± 0,018 ^{b/m} |
| | L-HC | 0,334 ± 0,033 ^{a/mn/x} | 0,386 ± 0,012 ^{c/m} | 0,311 ± 0,033 ^{a/n} |
| | L-PG | 0,279 ± 0,021 ^{a/m/y} | 0,319 ± 0,021 ^{b/m} | 0,293 ± 0,026 ^{a/m} |
| | L-GC | 0,408 ± 0,112 ^{a/m/x} | 0,264 ± 0,009 ^{a/m} | 0,258 ± 0,005 ^{a/m} |
| Potencial Z (mV) | L-V | -54,2 ± 1,5 ^{b/m/y} | -47,8 ± 1,2 ^{ab/n} | -45,5 ± 1,0 ^{a/n} |
| | L-HC | -54,9 ± 0,7 ^{b/m/y} | -50,8 ± 1,8 ^{a/n} | -49,8 ± 1,2 ^{b/n} |
| | L-PG | -57,2 ± 0,5 ^{ab/m/y} | -45,2 ± 2,1 ^{b/n} | -46,6 ± 2,1 ^{ab/n} |
| | L-GC | -59,1 ± 2,2 ^{a/m/y} | -44,1 ± 1,1 ^{b/n} | -47,5 ± 1,8 ^{ab/n} |

Las pastas liposomales liofilizadas (liposomas liofilizados) se conservaron a -20 °C durante 7 meses, periodo durante el cual se analizaron sus características de partícula para evaluar su estabilidad (Tabla 8). El índice de polidispersidad se mantuvo estable ($p > 0,05$) durante los 7 meses de conservación con distribuciones monomodales para todos los liposomas, con la excepción de los liposomas que contenían grasa de crustáceo (L-GC) que disminuyeron su valor

(pasando de una distribución bimodal a una monomodal). El tamaño medio disminuyó sus valores progresivamente para los liposomas vacíos, reduciéndose hasta un $\approx 82\%$ a mitad de su conservación y un $\approx 50\%$ al final de su conservación, mientras que para los liposomas con extractos alcanzó su talla final a los 3 meses, con un rango de valores de 150,0-183,3 nm, muy similares al valor final de L-V. A partir de este momento, el tamaño medio se mantuvo estable con un rango de 159,2-178,2 nm a tiempo 7 meses.

De igual modo sucede con el potencial zeta, que disminuye progresivamente para los liposomas vacíos un $\approx 11-12\%$ y posteriormente hasta un $\approx 16\%$, si bien se mantienen muy electronegativos, mientras que para liposomas rellenos desciende rápidamente en los 3 primeros meses, manteniéndose estable hasta el final del periodo de estudio (desde -46,6 hasta -49,8 mV), momento en el cual los valores se asemejaban a los mostrados por los liposomas vacíos. Estos resultados indican que los liposomas son razonablemente estables conservados en congelación durante 7 meses, aunque en todos se observa un efecto de agregación inducido por la liofilización. Pu & Tang (2017) demostraron esta estabilidad en liposomas liofilizados durante 4 semanas y Liu et al. (2010) en liposomas conservados durante 4 meses.

Microscopía electrónica de transmisión a temperatura criogénica

Mediante microscopía electrónica de transmisión por criofijación se confirmaron los resultados obtenidos por dispersión dinámica de luz en Zetasizer. Las dispersiones liposomales (Figura 42) presentaron vesículas unilamelares pequeñas de morfología principalmente esférica. Estas vesículas mostraron un tamaño diferente pero dentro de un rango de tallas similares, como demostraron los valores de polidispersidad. En todas las suspensiones se observa algún caso de configuración bivesicular o de invaginación de vesículas.

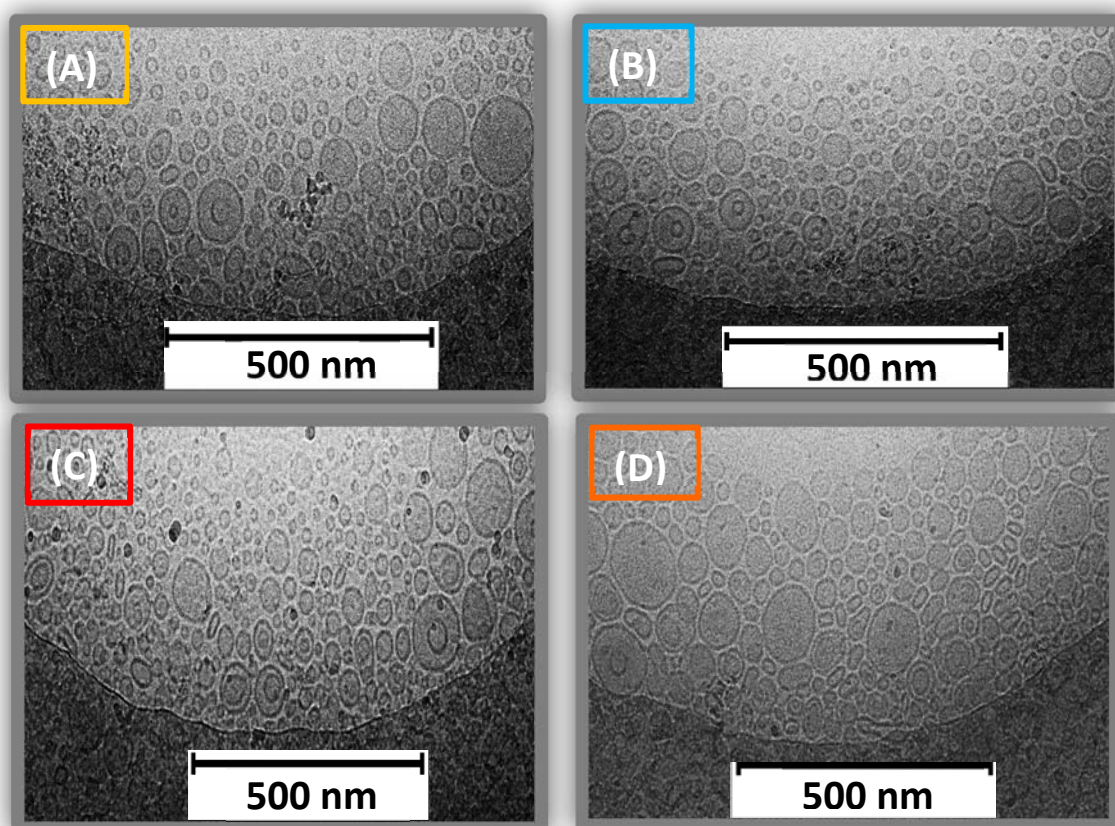


Figura 42. Fotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión por criofijación de dispersiones liposomales vacías y con extractos bioactivos recién preparadas. A) Liposomas vacíos (L-V); B) Liposomas con hidrolizado de colágeno (L-HC); C) Liposomas con piel de granada (L-PG); D) Liposomas con grasa de crustáceo (L-GC).

Por otra parte, los liposomas liofilizados (Figura 43) mostraron vesículas de mayor tamaño y una distribución de tamaños más heterogénea (como mostraron los parámetros de tamaño medio y polidispersidad de la tabla 8), incrementos debidos al proceso de liofilización. La morfología permanece mayoritariamente esférica aunque se observaron algunas vesículas de forma ovalada o irregular. También se apreciaron una mayor cantidad de invaginaciones y la presencia de vesículas bi o trilamelares en algunos liposomas conteniendo diversos bioactivos y multilamelares en los liposomas que contienen grasa de crustáceo (L-GC), además en este caso son especialmente grandes. Esta multilamellaridad fue favorecida por la naturaleza del extracto de grasa de crustáceo, cuya composición lipídica permitió la formación de varias membranas sobre algunas vesículas. Arranz & Corredig (2017) obtuvieron resultados similares mostrando liposomas de tamaño y morfología parecidos, algunos de ellos presentando invaginaciones y otros multilamellaridad.

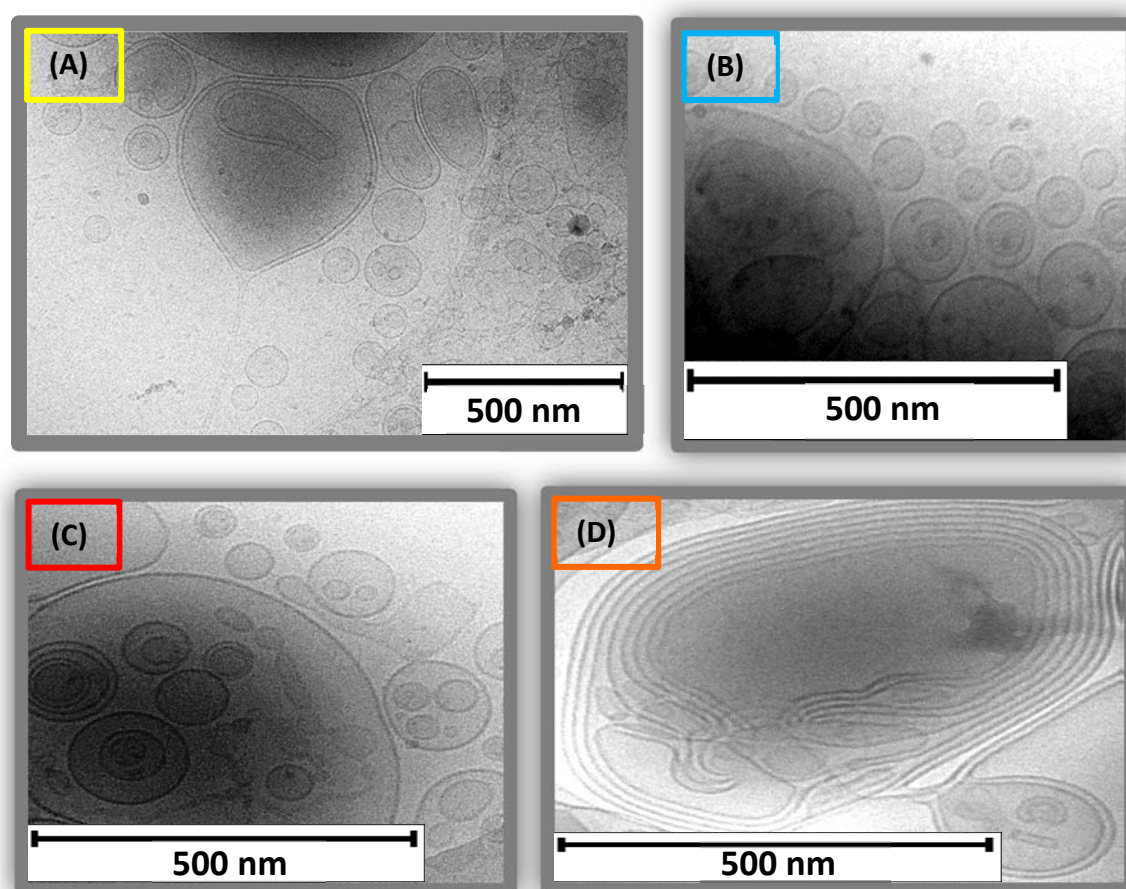


Figura 43. Fotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión por criofijación de liposomas liofilizados vacíos y con extractos bioactivos recién preparados. A) Liposomas vacíos (L-V); B) Liposomas con hidrolizado de colágeno (L-HC); C) Liposomas con piel de granada (L-PG); D) Liposomas con grasa de crustáceo (L-GC).

Eficacia de encapsulación

La eficacia de encapsulación de los liposomas liofilizados de hidrolizado de colágeno de túnica de calamar (L-HC) fue del 87,3 % (Tabla 9), valor muy superior al obtenido por Mosquera et al. (2016) para el mismo extracto encapsulado en liposomas similares (53 %). Esta diferencia se debió al distinto método de extracción del bioactivo (enzimas distintas) así como al diferente método de elaboración de los liposomas, factores que determinan una composición y estructura del bioactivo característica y una mayor o menor encapsulación del mismo. Este elevada encapsulación se atribuye a una alta concentración de aminoácidos hidrofóbicos en el extracto

(Mosquera et al., 2014). La eficacia de encapsulación para los liposomas liofilizados de piel de granada (L-PG) fue del 63,2 %, muy parecida a la obtenida por Yücel & Şeker-Karatoprak (2017) para liposomas incorporando ácido rosmarínico (55,6 %). Este valor fue inferior porque se trata de un extracto polifenólico complejo, lo que probablemente ocasiona que parte de este extracto no pueda ser eficientemente encapsulado. La eficacia de encapsulación de los liposomas liofilizados de grasa de crustáceo (L-GC) fue del 97,2 %, prácticamente idéntica a la obtenida por Tachaprutinuna et al. (2009) para nano-esferas conteniendo astaxantina (98 %). Este valor se atribuye a la propia naturaleza lipídica del extracto de grasa de crustáceo, que se localiza dentro de la bicapa lipídica hidrofóbica ya que es muy poco soluble en agua. Por esta razón, cuando los liposomas de GC se rehidratan en agua para su caracterización, el extracto no se ve afectado y no sale al exterior por el efecto de dilución con el agua, permaneciendo dentro de la bicapa, encapsulado prácticamente en su totalidad (Chen et al., 2010).

La eficacia de encapsulación no varió ($p \leq 0,05$) tras la conservación de los liposomas liofilizados durante 7 meses a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, en ninguno de los diferentes liposomas rellenos con los distintos bioactivos. Laverman et al. (2000) mostraron la estabilidad de liposomas liofilizados durante 1 año.

Tabla 9. Eficacia de encapsulación (%) de liposomas liofilizados con extractos bioactivos, recién preparados y conservados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 7 meses, donde L-HC: liposomas con hidrolizado de colágeno; L-PG: liposomas con piel de granada; L-GC: liposomas con grasa de crustáceo. Diferentes letras (a, b) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre liposomas para un mismo tiempo de conservación; (m) en la misma fila entre tiempos de conservación para una misma formulación liposomal liofilizada.

| | Eficacia de encapsulación (%) | | |
|------|-------------------------------|------------------------|------------------------|
| | 0 meses | 3 meses | 7 meses |
| L-HC | $87,25 \pm 1,97^{a/m}$ | $86,61 \pm 5,08^{a/m}$ | $89,60 \pm 2,20^{a/m}$ |
| L-PG | $63,19 \pm 3,90^{b/m}$ | $62,88 \pm 1,71^{b/m}$ | $62,44 \pm 3,03^{b/m}$ |
| L-GC | $97,24 \pm 0,08^{a/m}$ | $96,92 \pm 0,00^{a/m}$ | $96,96 \pm 0,09^{a/m}$ |

Propiedades físicas

Contenido en agua

El contenido en agua de las dispersiones liposomales (Tabla 10) fue muy elevado para todas las muestras, con valores comprendidos entre 92-93 %. La parte restante corresponde a materia seca atribuida a la fosfatidilcolina y a los extractos bioactivos encapsulados.

El contenido en agua de los liposomas liofilizados (Tabla 10) fue mucho menor que el de las dispersiones, con valores comprendidos entre 18,5-24,9 %, sin diferencias entre liposomas ($p > 0,05$). Ye et al. (2017) mostraron valores de contenidos en agua inferiores al 15 % en liposomas liofilizados. Este elevado contenido en agua para las muestras liofilizadas se atribuye a la presencia de glicerol en las preparaciones liposomales, el cual, dada su densidad superior a la del agua ($1,26\text{ g/cm}^3$), provoca un incremento del estado de hidratación de las muestras (Manca et al., 2013), lo que da lugar a liposomas liofilizados con una textura pegajosa y grasa, muy diferente al típico polvo fino liofilizado con bajo contenido en agua que se presenta cuando carece de este compuesto. El glicerol es un reconocido crioprotector que mejora la estabilidad de las vesículas (Mozafari, 2005) y protege a los liposomas frente a daños ocasionados por los procesos de congelación y liofilización (Stark et al., 2010). Esta textura se observó claramente a nivel visual.

El contenido en agua de los liposomas liofilizados fue estable ($p>0,05$) en el tiempo durante al menos 7 meses (Tabla 10) para los liposomas vacíos, mientras que presentó fluctuaciones en sus valores para los tres tipos de liposomas conteniendo bioactivos tanto a 3 como a 7 meses. Estas fluctuaciones, atribuidas a la presencia de los extractos bioactivos encapsulados y a su interferencia con la cápsula y con el agua, fueron pequeñas y los valores finales de contenido en agua oscilaron entre 11,7-18,1 % (valores cercanos a los mostrados por los liposomas vacíos). Estos valores fueron inferiores a los iniciales, dando a entender que se está produciendo un fenómeno de desecación y posterior compactación, como demostraron los resultados de Zetasizer.

Dispersabilidad en agua

Las dispersiones liposomales mostraron porcentajes de dispersabilidad en agua muy elevados, entre 74,3 y 87,6 %, indicando que la presencia de glicerol y su consecuente mayor hidratación no afectó negativamente a dicha propiedad. Esta dispersabilidad fue ligeramente superior para los liposomas rellenos con extractos que para los vacíos, indicando que los extractos bioactivos favorecen la dispersabilidad en agua de la cápsula, posiblemente debido a su interferencia con la bicapa lipídica, ya que las interacciones moleculares entre la fosfatidilcolina y el bioactivo encapsulado determinan las propiedades físicas de los liposomas (Toniazzi et al., 2017).

Tabla 10. Contenido en agua (%) y dispersabilidad en agua (%) de dispersiones liposomales recién preparadas, y de liposomas liofilizados recién preparados y conservados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 7 meses, donde L-V: liposomas vacíos; L-HC: liposomas con hidrolizado de colágeno; L-PG: liposomas con piel de granada; L-GC: liposomas con grasa de crustáceo. Diferentes letras (a, b, c) en la misma columna indican diferencias significativas ($p\leq 0,05$) entre liposomas para un mismo estado físico y tiempo de conservación; (m, n) en la misma fila entre tiempos de conservación para una misma formulación liposomal liofilizada; (x, y) en la misma fila entre diferentes estados físicos a tiempo 0 para una misma formulación liposomal.

| | | Dispersiones | | Liofilizados | |
|-----------------------------|------|----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| | | 0 semanas | 0 meses | 3 meses | 7 meses |
| Contenido en agua (%) | L-V | 91,97 \pm 0,57 ^{a/x} | 18,48 \pm 2,20 ^{a/m/y} | 16,60 \pm 2,38 ^{b/m} | 17,06 \pm 1,33 ^{a/m} |
| | L-HC | 92,75 \pm 0,27 ^{a/x} | 21,30 \pm 1,10 ^{a/m/y} | 10,03 \pm 2,30 ^{a/n} | 11,74 \pm 2,29 ^{a/n} |
| | L-PG | 92,65 \pm 0,36 ^{a/x} | 24,39 \pm 2,64 ^{a/m/y} | 10,27 \pm 2,36 ^{a/n} | 15,12 \pm 4,33 ^{a/n} |
| | L-GC | 92,77 \pm 0,50 ^{a/x} | 24,87 \pm 4,55 ^{a/m/y} | 10,09 \pm 1,78 ^{a/n} | 18,62 \pm 4,11 ^{a/m} |
| Dispersabilidad en agua (%) | L-V | 74,34 \pm 11,49 ^{a/x} | 73,63 \pm 2,62 ^{b/m/x} | 73,54 \pm 0,69 ^{b/m} | 73,56 \pm 1,77 ^{b/m} |
| | L-HC | 87,36 \pm 3,98 ^{a/x} | 76,45 \pm 0,37 ^{b/m/y} | 74,51 \pm 1,53 ^{b/m} | 87,12 \pm 2,50 ^{b/n} |
| | L-PG | 83,90 \pm 3,93 ^{a/x} | 80,90 \pm 1,66 ^{c/m/x} | 78,64 \pm 3,59 ^{b/m} | 85,25 \pm 13,17 ^{b/m} |
| | L-GC | 87,60 \pm 3,99 ^{a/x} | 65,22 \pm 1,33 ^{a/m/y} | 49,69 \pm 4,19 ^{a/n} | 56,24 \pm 5,77 ^{a/mn} |

Los liposomas liofilizados mantuvieron valores de dispersabilidad significativamente iguales para L-V (73,6 %) y L-PG (80,9 %), mientras que disminuyen ($p\leq 0,05$) para L-HC hasta 76,5 % y para L-GC hasta 65,2 %. Tras su conservación durante 7 meses en congelación, la dispersabilidad de los liposomas vacíos y de los liposomas de piel de granada se mantuvo estable ($p\leq 0,05$), mientras que la de los de hidrolizado de colágeno fluctúa con el tiempo hasta alcanzar a los 7 meses el valor obtenido en la dispersión fresca inicial (87,1 %). Los liposomas de grasa de crustáceo, aparte de ser los que más disminuyeron su valor tras ser liofilizados, siguieron un comportamiento descendente con el tiempo hasta llegar a valores de 56,2 % a los 7 meses. Este descenso podría atribuirse a la baja solubilidad en agua del extracto de GC y a la mayor agregación vesicular (multilamelar), la cual limita la capacidad de dispersabilidad del liofilizado. Peng et al. (2010) obtuvieron similares conclusiones para liposomas de astaxantina.

Color

Visualmente, los liposomas vacíos (L-V) y con hidrolizado de colágeno (L-HC) presentaron una tonalidad amarilla-marrón suave, los liposomas de piel de granada (L-PG) un color marrón oscuro, y los liposomas de grasa de crustáceo (L-GC) naranja.

Se llevó a cabo la evaluación instrumental del color de los liposomas liofilizados (Figura 44), a través de los parámetros de cromaticidad y tonalidad, así como de sus datos primarios del sistema color CIELab: L* (luminosidad), a* (intervalo rojo-verde) y b* (intervalo amarillo-azul). Los parámetros cuantitativos del sistema color CIELab confirmaron estos resultados cualitativos.

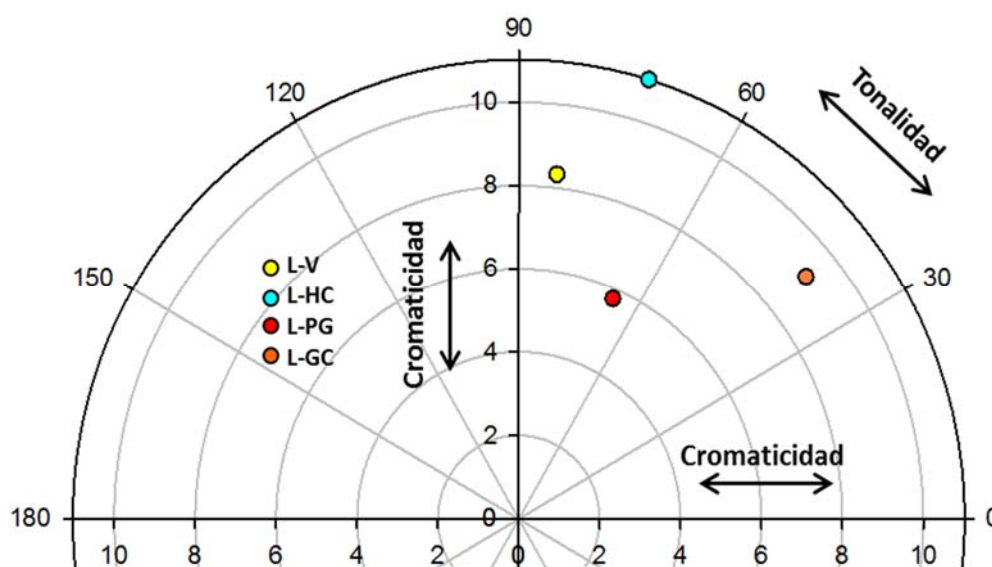


Figura 44. Gráfico reflejando los parámetros de color cromaticidad y tonalidad de liposomas liofilizados vacíos y con extractos bioactivos recién preparados, donde L-HC: liposomas con hidrolizado de colágeno; L-PG: liposomas con piel de granada; L-GC: liposomas con grasa de crustáceo.

El parámetro b* (Tabla 11), que representa la abundancia de color amarillo, fue significativamente mayor en L-V (8,27) y L-HC (10,54) que en L-PG (5,27) y L-GC (5,80), ya que estos primeros liposomas presentaron una tonalidad amarilla clara. Igual sucede con el parámetro L* (luminosidad) donde los liposomas L-V y L-HC, con valores de $\approx 32,6$, fueron superiores ($p \leq 0,05$) a L-PG y L-GC, puesto que una tonalidad de color más suave implica una mayor claridad y por tanto luminosidad. En la figura 44 se puede apreciar como los valores de tonalidad para estos dos liposomas son relativamente cercanos, aunque no tanto para la cromaticidad. Los liposomas de piel de granada mostraron el valor significativamente más bajo (27,8) debido a su fuerte color marrón y su menor claridad. El parámetro a*, que representa la abundancia de color rojo, fue mucho mayor ($p \leq 0,05$) para los liposomas de grasa de crustáceo (7,1) debido a su fuerte color naranja (valor de tonalidad de 39,25 °), siendo el valor más distante en tonalidad de los liposomas vacíos, pero cercanos en cromaticidad, al contrario que para el resto de los liposomas. Esta coloración se corresponde con los carotenoides presentes en el extracto de GC (Gómez-Estaca et al., 2017), donde los anillos terminales de la astaxantina (carotenoide) se localizan preferentemente en la superficie de membrana de los liposomas (Hama et al., 2012), dando lugar a esta coloración anaranjada.

En el caso de L-PG, la coloración marrón oscura se atribuyó a la elevada concentración de polifenoles presentes en el extracto de piel y albedo de granada (responsables de la coloración marrón-morada de los frutos ricos en este tipo de compuestos activos). A pesar de que el extracto está encapsulado, la eficacia de encapsulación para estos liposomas fue del 63,2 %, lo

que indica que hay un elevado porcentaje de extracto bioactivo que se encuentra fuera de ellos en el espacio intervesicular, aportando esta coloración característica. El color de los liposomas vacíos fue correspondido con el color amarillento de la fosfatidilcolina mientras que el color de los liposomas de hidrolizado de colágeno fue parecido al vacío (L-V) debido a que el extracto de HC, que posee una coloración blanquecina, no aporta prácticamente color adicional a los liposomas, confirmando su elevada eficacia de encapsulación.

Tabla 11. Parámetros de color del sistema CIELab: L* (luminosidad), a* (intervalo rojo-verde), b* (intervalo amarillo-azul) de liposomas liofilizados vacíos y con extractos bioactivos recién preparados, donde L-HC: liposomas con hidrolizado de colágeno; L-PG: liposomas con piel de granada; L-GC: liposomas con grasa de crustáceo. Diferentes letras (a, b, c, d) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre liposomas.

| | L*(D65) | a*(D65) | b*(D65) |
|------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| L-V | 32,52 \pm 0,22 ^c | 0,95 \pm 0,09 ^a | 8,27 \pm 0,14 ^c |
| L-HC | 32,71 \pm 0,22 ^c | 3,23 \pm 0,20 ^c | 10,54 \pm 0,18 ^d |
| L-PG | 27,81 \pm 0,22 ^a | 2,33 \pm 0,07 ^b | 5,27 \pm 0,27 ^a |
| L-GC | 29,06 \pm 0,25 ^b | 7,10 \pm 0,21 ^d | 5,80 \pm 0,22 ^b |

Calorimetría Diferencial de Barrido

La Calorimetría Diferencial de Barrido se analizó para las dispersiones liposomales recién preparadas (Figura 45A). Todas las dispersiones mostraron un definido pico endotérmico a temperaturas sub-zero (<0 °C). Dada su cercanía con el punto de fusión del agua (0 °C) y que las dispersiones son predominantemente acuosas (92-93 %), este pico endotérmico se relaciona con la fusión del agua contenida en los liposomas. Las dispersiones con extractos bioactivos presentaron esta transición de fase a una temperatura mayor (de -3,9 °C hasta -4,3 °C) que las dispersiones vacías (-6,6 °C). Su valor de entalpía también fue mayor (161,8-171,6 J/g) que en la dispersión vacía (120,6 J/g). Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Lopes de Azambuja et al. (2015) para liposomas de asolecitina-genisteína, e indicarían una clara interferencia de los extractos bioactivos en la membrana vesicular, independientemente de la naturaleza de los mismos.

L-V posee un segundo pico endotérmico minoritario (10,8 °C y 3,0 J/g) conocido como pre-transición de fase o Tg, asociado a un mayor ordenamiento de membrana, el cual está ausente en el resto de suspensiones, confirmando la hipótesis anterior. Esto se debe a que los compuestos bioactivos son capaces de intercalarse en la bicapa lipídica e interferir con las cabezas polares, induciendo cambios estructurales en los liposomas. Otros autores ya describieron previamente el efecto de desorden de membrana que ejercen los compuestos bioactivos sobre los liposomas, reflejados por la disminución de la pre-transición Tg (Yokota et al., 2012) y por la disminución de la temperatura media de transición o Tm (Nogueira et al., 2018), que no ha sido observada en estas muestras.

En los liposomas liofilizados (Figura 45B) se apreció un único evento endotérmico en cada una de las muestras. El pico de esta transición de fase fue bastante más difuso debido a la reducción de agua sufrida en la muestra, cuya ausencia dificulta su medición. Esto dio lugar a que los valores de las entalpías asociadas a cada pico fuesen demasiado bajos (inferiores a 1 J/g) como para ser tenidos en cuenta en la discusión. Las temperaturas de este pico fueron mayores (temperaturas >0 °C) que para las dispersiones, indicando que los liposomas en estado liofilizado tienen una mayor rigidez y estabilidad de membrana que las dispersiones liposomales, así como un mayor y mejor ordenamiento de la bicapa lipídica. Esto se debe a que el proceso de

lío-filización provoca una compactación mediante la eliminación del agua contenida en la muestra, lo que disminuye el espacio entre las cabezas polares de los fosfolípidos de la bicapa, induciendo un efecto de compresión y organización de los lípidos (Koster et al., 2000).

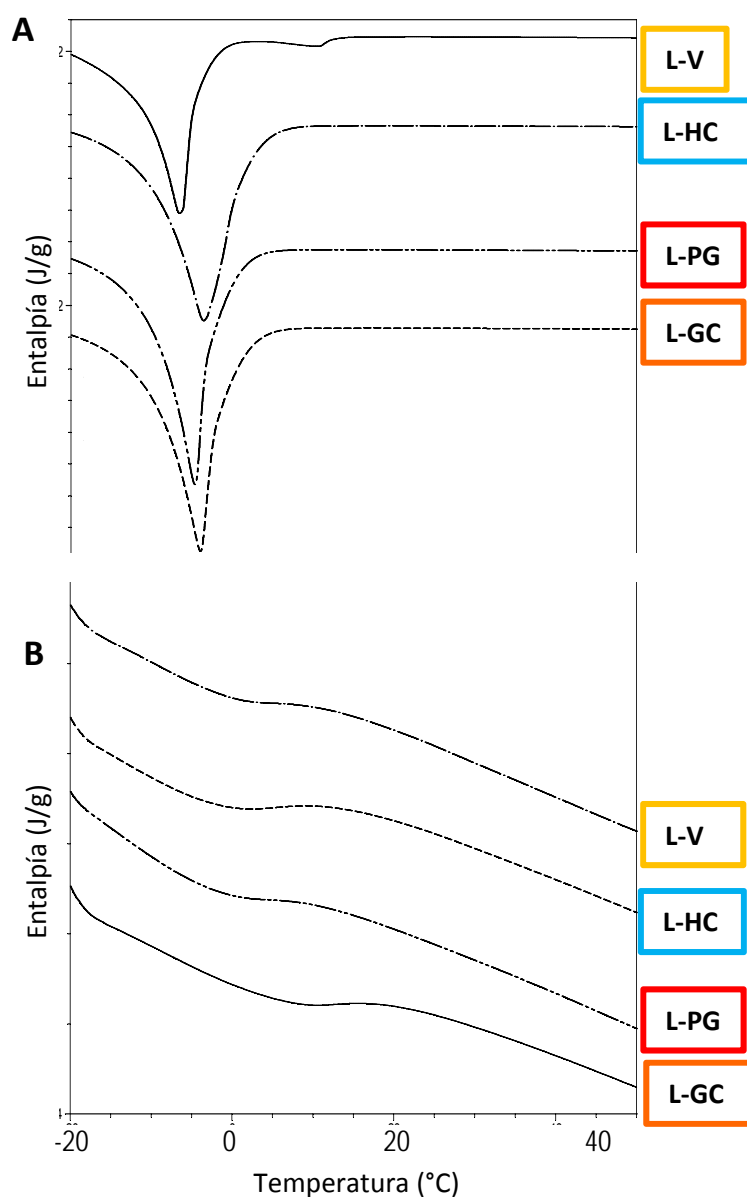


Figura 45. Termogramas analizados mediante Calorimetría Diferencial de Barrido reflejando las transiciones de fase de liposomas vacíos y con extractos bioactivos recién preparados, donde L-V: liposomas vacíos; L-HC: liposomas con hidrolizado de colágeno; L-PG: liposomas con piel de granada; L-GC: liposomas con grasa de crustáceo. A) Dispersiones liposomales. B) Liposomas liofilizados.

Esta mejor estabilidad térmica de los liofilizados fue diferente en función del bioactivo incorporado. Los liposomas con extractos de HC (2,0 °C) y PG (1,8 °C) mantuvieron una temperatura de transición de fase inferior a la de los liposomas vacíos (4,0 °C), lo que significa que siguieron siendo estructuras menos ordenadas respecto a L-V. Sin embargo, la temperatura de transición de los liposomas de GC fue de 11,1 °C, muy superior ($p \leq 0,05$) a la de L-V y el resto de liposomas rellenos, lo que se traduce en una evidente mejor estabilidad y ordenamiento de membrana. Estas mejores propiedades de L-GC se atribuyen a los compuestos liposolubles del extracto de GC, que fueron fuertemente embebidos en la bicapa lipídica contribuyendo a un

incremento de la estabilidad de la membrana de los liposomas. En particular, el colesterol (compuesto presente en nuestro extracto de grasa de crustáceo) es conocido por ser un agente activo que proporciona rigidez y estabilidad a las membranas lipídicas de fosfatidilcolina (Sułkowski et al., 2005). Este mayor ordenamiento coincide con la mayor multilamellaridad de los liposomas que contienen grasa de crustáceo.

La tabla 12 muestra los valores de los cambios de temperatura y entalpía de las transiciones de fase tanto de las dispersiones como de los liofilizados conservados en congelación hasta 7 meses. Los liposomas de GC mantuvieron sus valores de temperatura de transición constantes durante este tiempo ($p > 0,05$), lo que confirma su alto nivel de estructuración y estabilidad de la membrana. En contraposición, están los liposomas L-V y L-HC que van disminuyendo progresivamente sus temperaturas con el paso del tiempo hasta llegar a valores negativos a los 7 meses, indicando que no son muy estables térmicamente. Otro caso es del L-PG, el cual disminuye drásticamente su temperatura a los 3 meses pero la vuelve a recuperar a los 7 meses, dando a entender que aunque recupere su valor inicial de temperatura es una muestra algo inestable que sufre importantes cambios y fluctuaciones en el tiempo.

Tabla 12. Cambios de temperatura (T , °C) y entalpía (ΔH , J/g) de las transiciones de fase analizadas mediante Calorimetría Diferencial de Barrido de dispersiones liposomales recién preparadas y de liposomas liofilizados recién preparados y conservados hasta 7 meses a -20 °C, donde L-V: liposomas vacíos; L-HC: liposomas con hidrolizado de colágeno; L-PG: liposomas con piel de granada; L-GC: liposomas con grasa de crustáceo. Diferentes letras (a, b, c) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre liposomas para un mismo estado físico y tiempo de conservación; (m, n) en la misma fila entre tiempos de conservación para una misma formulación liposomal liofilizada; (x, y) en la misma fila entre diferentes estados físicos a tiempo 0 para una misma formulación liposomal.

| | | Dispersiones | | Liofilizados | |
|----------------------|------|-------------------------|--------------------------|-----------------------|------------------------|
| | | 0 semanas | 0 meses | 3 meses | 7 meses |
| $T_{pico 1}$ (°C) | L-V | $-6,59 \pm 0,20^{a/x}$ | $3,98 \pm 1,06^{a/m/y}$ | $0,85 \pm 0,86^{a/n}$ | $-0,53 \pm 0,27^{a/n}$ |
| | L-HC | $-3,91 \pm 0,40^{b/x}$ | $2,04 \pm 0,00^{a/m/y}$ | $1,15 \pm 0,92^{a/m}$ | $-1,30 \pm 0,48^{a/n}$ |
| | L-PG | $-4,24 \pm 0,66^{ab/x}$ | $1,76 \pm 0,47^{a/m/y}$ | $0,48 \pm 0,08^{a/n}$ | $1,66 \pm 0,00^{b/m}$ |
| | L-GC | $-4,29 \pm 0,35^{ab/x}$ | $11,05 \pm 0,93^{b/m/y}$ | $9,69 \pm 0,38^{b/m}$ | $10,19 \pm 0,13^{c/m}$ |
| Entalpía (J/g) | L-V | $120,6 \pm 0,64^a$ | - | - | - |
| | L-HC | $171,6 \pm 0,07^b$ | - | - | - |
| | L-PG | $161,8 \pm 4,38^b$ | - | - | - |
| | L-GC | $166,8 \pm 3,81^b$ | - | - | - |

Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier

La figura 46 muestra las frecuencias más representativas obtenidas de la Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier de los liposomas liofilizados.

Las variaciones a $\approx 2925 \text{ cm}^{-1}$ y $\approx 2850 \text{ cm}^{-1}$, relacionadas respectivamente con las vibraciones de los grupos CH_2 asimétricos y simétricos, representan los cambios que suceden en las cadenas hidrocarbonadas de la bicapa lipídica. Ambas frecuencias siguieron el mismo patrón, por lo que se muestran únicamente las de 2925 cm^{-1} (Figura 46A). Las frecuencias a $\approx 2925 \text{ cm}^{-1}$ fueron idénticas para los liposomas recién liofilizados L-V, L-HC y L-PG, mientras que disminuyeron para L-GC. Este menor valor en L-GC indica una menor movilidad de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos y por tanto una mayor rigidez en el interior de la bicapa como consecuencia de la naturaleza lipofílica del extracto de GC, cuyas interacciones hidrofóbicas con las cadenas acilo de la membrana dan lugar a un fenómeno de ordenamiento. Toyran & Severcan (2003) extrajeron similares conclusiones para liposomas con el compuesto hidrofóbico vitamina D.

Estas conclusiones estuvieron en concordancia con las observadas en calorimetría. Los picos de frecuencia correspondientes a los grupos funcionales CH_2 disminuyeron a periodos de 3 y 7 meses, indicando un incremento en la rigidez de la membrana y una mejor estabilidad con el paso del tiempo. Este hecho coincide con la reducción del tamaño medio de los liposomas liofilizados observada en Zetasizer cuando son conservados en el tiempo.

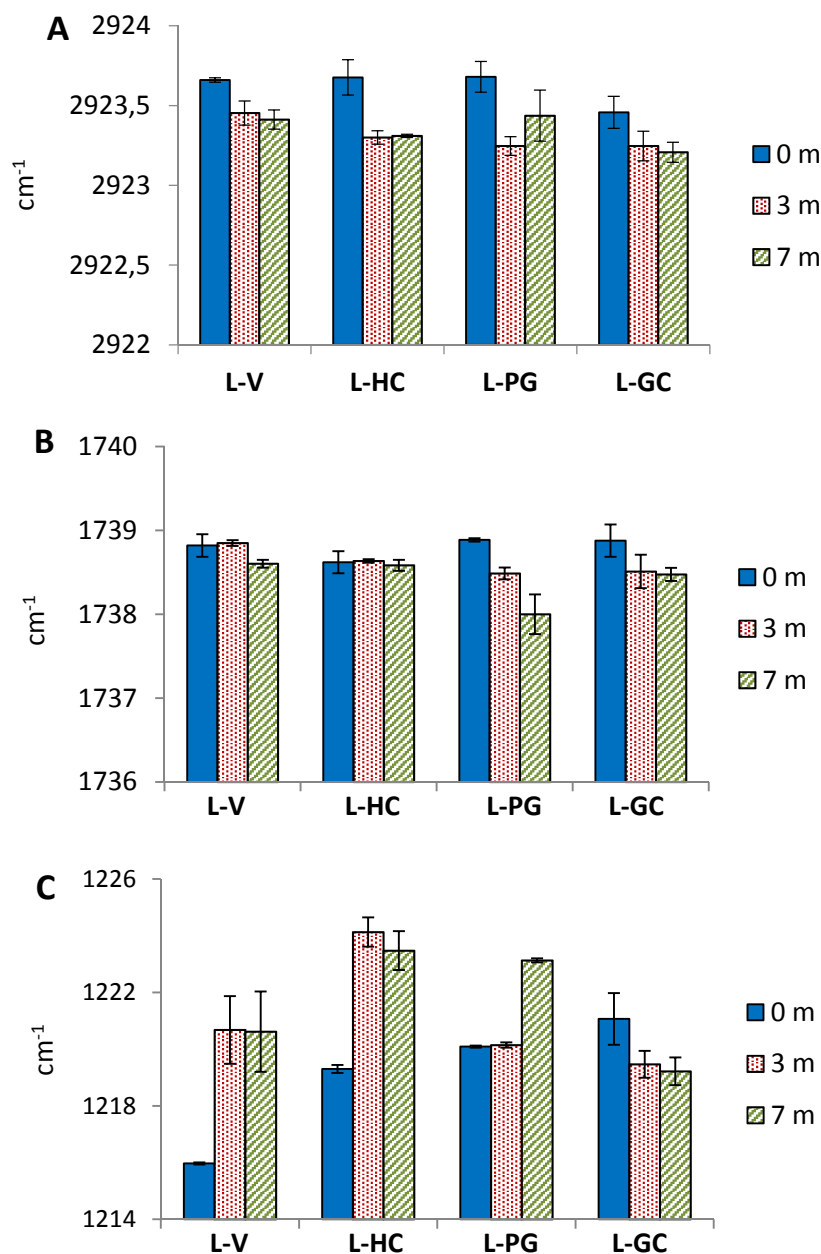


Figura 46. Espectro Infrarrojo con Transformada de Fourier de liposomas liofilizados vacíos y con extractos bioactivos recién preparados y conservados hasta 7 meses a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, donde L-V: liposomas vacíos; L-HC: liposomas con hidrolizado de colágeno; L-PG: liposomas con piel de granada; L-GC: liposomas con grasa de crustáceo. A) Vibraciones de estiramiento de los grupos CH_2 asimétricos. B) Vibraciones de estiramiento de los grupos $\text{C}=\text{O}$. C) Vibraciones de estiramiento de los grupos PO_2^- asimétricos de doble enlace.

Las variaciones de frecuencia en $\approx 1740\text{ cm}^{-1}$ (Figura 46B) están relacionadas con las vibraciones de los grupos funcionales $\text{C}=\text{O}$, que reflejan cambios estructurales asociados al estado de hidratación de los grupos carbonilo de la parte interfacial de la membrana (Toyran & Severcan,

2003). Únicamente los liposomas L-HC presentaron cambios a esta frecuencia con respecto a los liposomas L-V. Este cambio (un ligero descenso de la frecuencia) demuestra que existe una cierta interacción entre el extracto bioactivo (HC) y los grupos carbonilo de la cápsula. El hidrolizado de colágeno es un extracto completamente soluble en agua, por lo que se presupone que su localización dentro de los liposomas será preferentemente en el núcleo acuoso. Sin embargo, los péptidos incorporados en liposomas tienden a localizarse cerca de la región polar de los fosfolípidos, orientados paralelamente a la superficie de membrana (Ringstad et al., 2008; Orädd et al., 2011), lo que significa que la mayor parte del péptido (HC) estaría situada en el núcleo acuoso cerca de la parte interfacial de la bicapa, facilitando así su interacción con los grupos carbonilo de ésta. La conservación en congelación de L-PG y L-GC mostró un descenso de la frecuencia, lo que podría indicar una deshidratación de los grupos carbonilo como consecuencia de interacciones de estos bioactivos con la membrana. Mientras que L-HC no experimentó cambios con el tiempo, L-V también sufrió un descenso de la frecuencia a partir de los 3 meses de conservación, lo que indicaría que la deshidratación de este grupo funcional también podría ser el resultado de cambios estructurales intrínsecos de la propia membrana, independientemente de la presencia o no de bioactivo encapsulado.

Las variaciones de frecuencia a $\approx 1220\text{ cm}^{-1}$, relacionadas con las vibraciones de los grupos funcionales PO_2^- asimétricos, dan información sobre los grupos asociados a las cabezas polares de los fosfolípidos de la membrana (Figura 46C). El aumento de frecuencia por parte de los liposomas con bioactivos respecto a los vacíos indica una reducción del estado de hidratación de los grupos fosfato en los liposomas rellenos como resultado de su fuerte interacción por puentes de hidrógeno con los extractos bioactivos. Lopes de Azambuja et al. (2015) obtuvieron similares resultados para liposomas de genisteína liofilizados. Este incremento fue diferente en función del bioactivo encapsulado, en orden creciente L-HC, L-PG y L-GC. Esto demuestra una mayor interacción del extracto de GC con los grupos fosfato que el resto de extractos, lo que desemboca en un mayor estado de deshidratación de dichos grupos y en una mayor compactación/agregación de los liposomas L-GC. Esta afirmación concuerda con sus menores valores de dispersabilidad en agua, dando a entender que su grado de agregación es mayor que en el resto de liposomas. Tras la conservación en congelación, L-GC disminuye sus valores de frecuencia en contraposición a L-V y L-HC que los aumentan a partir de los 3 meses, mientras que en el caso de L-PG sucede a partir de los 7 meses. Esto significa que la gran rigidez inicial de la bicapa de los liposomas de GC y su fuerte interacción con las cabezas polares de los fosfolípidos probablemente restringen futuros cambios conformacionales en el tiempo, dándole una mayor estabilidad.

Reología dinámica oscilatoria

El espectro mecánico, ajustado al modelo de la ley de la potencia ($R^2 > 0,99$), representando los módulos elástico (G') y viscoso (G'') de los liposomas recién liofilizados en función de un barrido de frecuencias que abarca desde 0,1 Hz hasta 10 Hz y temperatura constante (10 °C), se muestra en la figura 47.

Todos los espectros presentaron mayores valores de G'' (viscoso) que de G' (elástico) y un ángulo de fase $>45^\circ$, lo que quiere decir que los liposomas liofilizados mostraron un comportamiento predominantemente viscoelástico más típico de un fluido altamente viscoso que de un material sólido. Este comportamiento se atribuye al efecto plastificante del glicerol incorporado en todas las preparaciones liposomales.

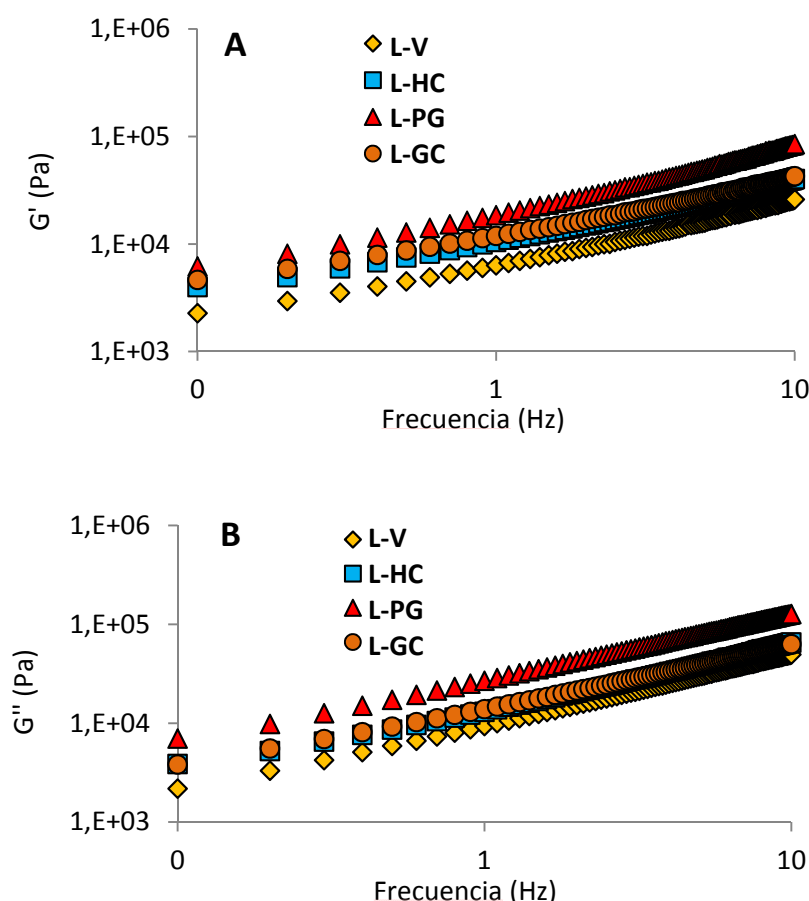


Figura 47. Espectros mecánicos en función de un barrido de frecuencias desde 0,1 hasta 10 Hz a temperatura constante de 10 °C de los liposomas liofilizados, donde L-V: liposomas vacíos; L-HC: liposomas con hidrolizado de colágeno; L-PG: liposomas con piel de granada; L-GC: liposomas con grasa de crustáceo. A) Módulo elástico (G' , Pa). B) Módulo viscoso (G'' , Pa).

Los parámetros viscoelásticos (G' , G'' y δ) a 1 Hz y el valor del exponente n' (obtenido del ajuste del espectro mecánico de G' a la ecuación de la ley de la potencia) se presentan en la figura 48. Recién elaborados, los liposomas con bioactivos mostraron mayores valores tanto de G' como de G'' respecto a los vacíos, sin cambios significativos en el ángulo de fase (siempre superior para G''). Estos resultados indican que la adición del extracto bioactivo no modifica el carácter viscoelástico de los liposomas y que los liofilizados rellenos fueron más consistentes que el liofilizado vacío. Este efecto se debió a las interacciones de los componentes bioactivos con los grupos de las cabezas polares de los fosfolípidos de membrana.

El valor de la ley de la potencia refleja la estabilidad estructural de una matriz y cuanto mayor es su valor, menor es la estabilidad de la matriz frente a cambios de frecuencia. Mientras que L-GC mostró el menor valor de n' y por tanto una mayor estabilidad (resultado que concuerda con los obtenidos en calorimetría y espectroscopía infrarroja), L-PG fue el que obtuvo el mayor valor de n' y la mayor inestabilidad, coincidiendo con un mayor valor de G'' . Este efecto podría atribuirse a la baja eficacia de encapsulación de L-PG (63,2 %) respecto al resto de liposomas, cuyos compuestos mayoritariamente polifenólicos no encapsulados harían de obstáculo y dificultarían las interacciones del extracto con la bicapa y de las bicapas entre sí, reduciendo la estabilidad de la matriz. Estos resultados están en concordancia con la mayor dispersabilidad en agua encontrada para los liposomas de piel de granada, la cual es indicativa de una menor compactación/agregación y por tanto menor estabilidad.

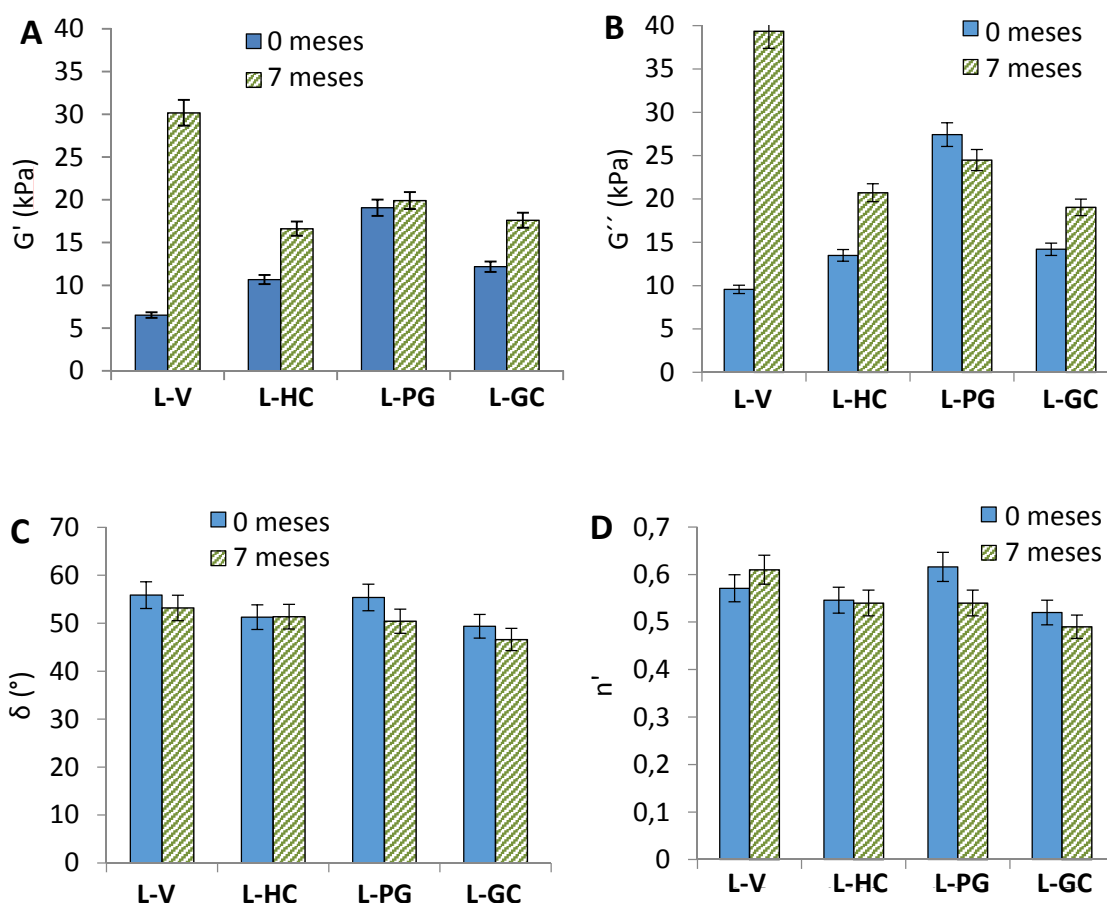


Figura 48. Parámetros viscoelásticos a frecuencia 1 Hz y temperatura 10 °C de liposomas liofilizados vacíos y con extractos bioactivos recién preparados y conservados hasta 7 meses a -20 °C, donde L-V: liposomas vacíos; L-HC: liposomas con hidrolizado de colágeno; L-PG: liposomas con piel de granada; L-GC: liposomas con grasa de crustáceo. A) Módulo elástico (G' , kPa). B) Módulo viscoso (G'' , kPa). C) Ángulo de fase (δ , °). D) Exponente de la ley de la potencia (n').

Los liposomas liofilizados conservados en congelación, con excepción de los encapsulados con extracto de piel y albedo de granada (L-PG), mostraron un notable aumento de sus valores a 1 Hz de G' y G'' a los 7 meses, lo que se traduce en un incremento de la dureza o consistencia de la matriz con el transcurso del tiempo, resultados que coinciden con el aumento de la rigidez de membrana en el tiempo observados mediante espectroscopía infrarroja. Entre ellos, los liposomas vacíos (L-V) fueron los que más aumentaron, y como consecuencia mayor dureza experimentaron. En el caso de L-PG, no se observa endurecimiento de la matriz (sin cambios significativos en G' y G'') probablemente debido a su elevada inestabilidad. En cambio, sí se apreció un destacado decremento en sus valores de ángulo de fase y ley de la potencia al final del periodo de conservación, lo que sugiere un ligero incremento de su estabilidad.

Los espectros de temperatura de los módulos elástico (G') y viscoso (G'') de los liposomas liofilizados desde 20 °C hasta 90 °C a frecuencia constante (1 Hz) se muestran en la figura 49.

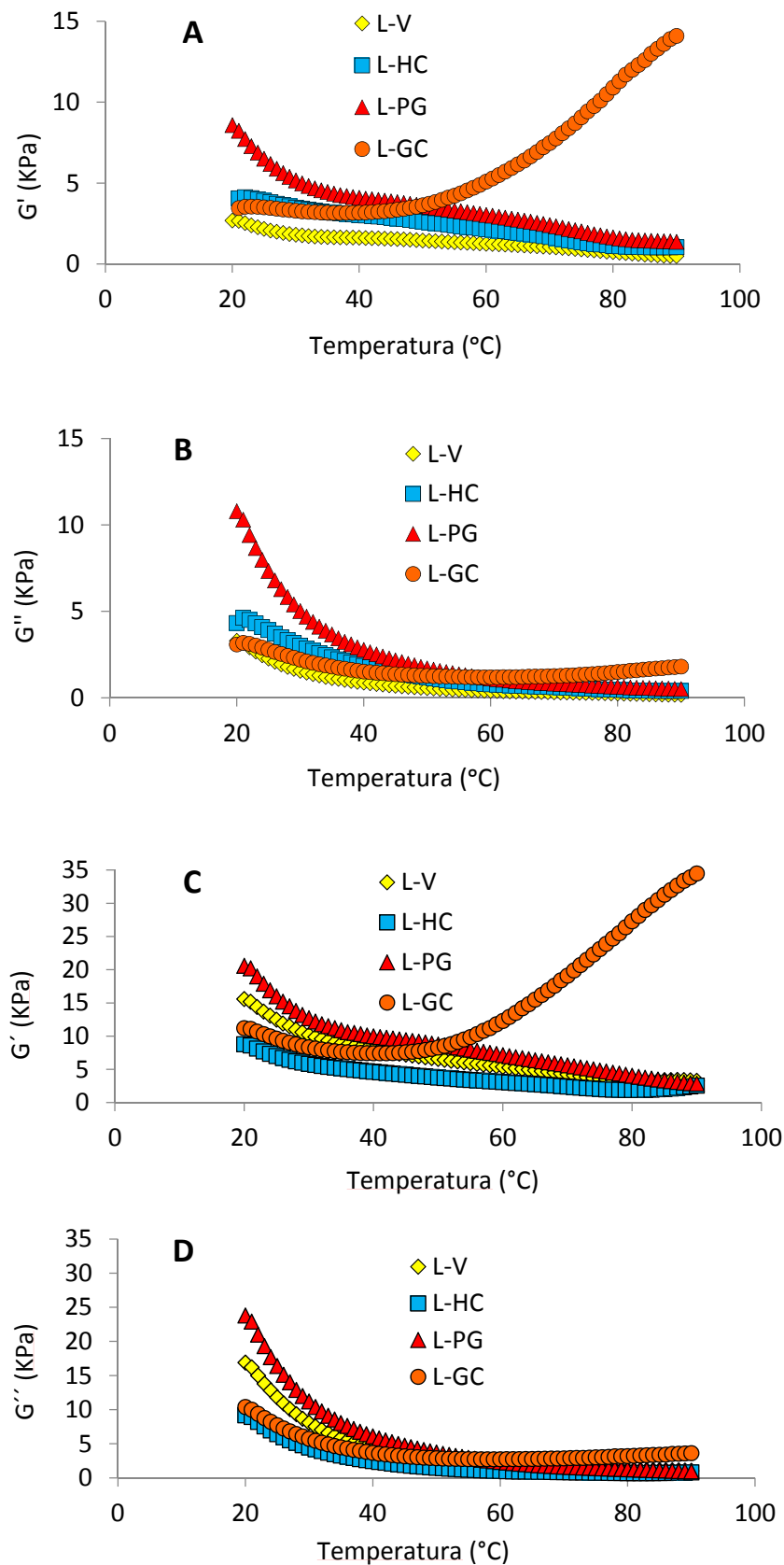


Figura 49. Comportamiento viscoelástico en función de un barrido de temperatura desde 20 $^{\circ}\text{C}$ hasta 90 $^{\circ}\text{C}$ a frecuencia constante de 1 Hz de liposomas liofilizados vacíos y con extractos bioactivos recién preparados y conservados hasta 7 meses a -20°C . A) Módulo elástico (G' , kPa) recién preparados. B) Módulo viscoso (G'' , kPa) recién preparados. C) Módulo elástico (G' , kPa) a 7 meses. D) Módulo viscoso (G'' , kPa) a 7 meses.

En los liposomas recién liofilizados, con excepción de L-GC, todas las muestras presentaron una disminución progresiva y constante de sus valores de G' y G'' con el aumento gradual de la temperatura, dando lugar a una pérdida de consistencia de la matriz. Tan et al. (2013) obtuvieron resultados parecidos para liposomas de fosfatidilcolina a partir de yema de huevo cuando éstos superaron los 50 °C de temperatura. Este fenómeno, desencadenado por el aumento de la temperatura, fue consecuencia de la rotura de las interacciones responsables de la fuerzas de adhesión entre los lípidos adyacentes a la bicapa y entre los lípidos internos de la bicapa (Augustyńska et al., 2016).

En el caso de L-GC, mientras que el módulo viscoso (G'') sufre un ligero descenso hasta los 66 °C, momento en el que se estabiliza, el módulo elástico (G') se mantiene estable hasta que experimenta un pronunciado y continuo incremento a partir de los 40 °C hasta los 90 °C, indicando que se ha producido la formación de una fuerte estructura tipo gel inducida por calor. Augustyńska et al. (2016) obtuvieron similares resultados para liposomas incorporando β -caroteno. Este incremento se atribuyó al extracto de GC, cuya naturaleza lipofílica favoreció la resistencia a la ruptura de enlaces por altas temperaturas y favoreció la estabilización de la membrana. Además, tiene lugar la formación de interacciones hidrofóbicas termoestables entre la membrana lipídica y las moléculas hidrofóbicas del extracto de GC, las cuales restringen la movilidad de los lípidos y de este modo mejoran la rigidez y estabilidad de la membrana (Tan et al., 2013), permitiendo la formación de esta estructura tipo gel.

El comportamiento térmico durante la conservación de estos liposomas liofilizados fue exactamente el mismo transcurridos 7 meses, con la diferencia de que los fenómenos de descenso y aumento de G' y G'' de todas las muestras fueron más marcados y los valores de los módulos elástico y viscoso fueron superiores a los de los liposomas recién liofilizados. Estos resultados indican que durante la conservación se produjo un incremento de las fuerzas de adhesión entre lípidos y un aumento de la rigidez de membrana, pero los liposomas L-V, L-HC y L-PG siguieron siendo susceptibles de rotura de enlaces y debilitamiento de su estructura, mientras que L-GC siguió siendo susceptible de la formación de interacciones hidrofóbicas que den lugar a la obtención de una estructura fuerte tipo gel, incluso con mejores propiedades que las obtenidas con los liposomas L-GC recién liofilizados.

Efecto oxidativo

El efecto oxidativo de los liposomas liofilizados se determinó mediante la medida de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, mostrada en la tabla 13. El contenido de equivalentes de malonaldehído en la fosfatidilcolina fue de $22,6 \pm 0,9 \mu\text{g/kg}$, valor superior al obtenido para las dispersiones liposomales ($8,2\text{-}18,4 \mu\text{g/kg}$). Este menor valor para las dispersiones podría indicar que la formación de la bicapa lipídica durante el proceso de elaboración de liposomas está limitando la interacción con las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico o que la conformación de liposomas está limitando la interacción, y por ello sus valores son menores a los de la fosfatidilcolina. Estos resultados indican que, aparte de que todos los valores fueron muy bajos (y por tanto la oxidación fue mínima), no hubo una acumulación perceptible de productos de oxidación lipídica tras el proceso de preparación de liposomas. Esto podría ser debido al efecto antioxidante proporcionado tanto por el contenido intrínseco de α -tocoferol en la fosfatidilcolina como por los diferentes extractos bioactivos en el caso de los liposomas con bioactivos.

En cuanto a los liposomas liofilizados, el contenido en malonaldehído se incrementó ($p \leq 0,05$) en todas las muestras tras el proceso de liofilización, y con él, la susceptibilidad de ser oxidados, probablemente como consecuencia de diferentes cambios conformacionales y estructurales en la bicapa lipídica ocasionados por el estrés infligido por la liofilización. Estos cambios podrían incrementar la exposición de los compartimentos hidrofóbicos de la bicapa al medio ambiente, y se sabe que los radicales libres y el oxígeno son más solubles en el fluido de la bicapa lipídica

(zona hidrofóbica) que en solución acuosa. De hecho, acorde a Guner & Oztop (2017), el buffer fosfato (medio en el que se prepararon los liposomas) contiene iones fosfato dihidrógeno, los cuales se conocen por disminuir la solubilidad del oxígeno y aumentar la oxidación liposomal. De este modo, la concentración de oxígeno en la fase orgánica de la membrana tras la rehidratación, debida a una mayor interacción del oxígeno y de los radicales libres con la bicapa de los liposomas (dada su buena afinidad por la zona hidrofóbica expuesta de la bicapa), produciría una mayor oxidación lipídica (Pamplona, 2008). A pesar de este aumento, los valores de malonaldehído fueron considerablemente bajos (46,6-81,8 $\mu\text{g/kg}$).

Tabla 13. Oxidación lipídica (μg MDA/kg muestra seca) analizada mediante el índice del ácido tiobarbitúrico de dispersiones liposomales recién preparadas y de liposomas liofilizados recién preparados y conservados durante 7 meses a -20°C , donde L-V: liposomas vacíos; L-HC: liposomas con hidrolizado de colágeno; L-PG: liposomas con piel de granada; L-GC: liposomas con grasa de crustáceo. Diferentes letras (a, b, c, d) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre liposomas para un mismo estado físico y tiempo de conservación; (m, n, o) en la misma fila entre tiempos de conservación para una misma formulación liposomal liofilizada; (x, y) en la misma fila entre diferentes estados físicos a tiempo 0 para una misma formulación liposomal.

| | Dispersiones | | Liofilizados | |
|------|------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 0 semanas | 0 meses | 3 meses | 7 meses |
| L-V | $8,22 \pm 1,94^{a/x}$ | $81,8 \pm 3,56^{a/m/y}$ | $65,2 \pm 1,29^{a/n}$ | $38,5 \pm 0,70^{a/o}$ |
| L-HC | $18,4 \pm 2,10^{c/x}$ | $69,2 \pm 2,97^{b/m/y}$ | $44,2 \pm 1,25^{b/n}$ | $32,3 \pm 1,30^{b/o}$ |
| L-PG | $9,80 \pm 0,00^{ab/x}$ | $46,6 \pm 2,86^{d/m/y}$ | $24,7 \pm 5,89^{d/n}$ | $23,5 \pm 1,23^{c/n}$ |
| L-GC | $12,4 \pm 1,05^{b/x}$ | $58,5 \pm 4,74^{c/m/y}$ | $33,3 \pm 4,31^{c/n}$ | $15,5 \pm 0,29^{d/o}$ |

Entre los diferentes liposomas liofilizados, los vacíos fueron los que presentaron un mayor contenido en malonaldehído ($p \leq 0,05$) con un valor de 81,8 $\mu\text{g/kg}$, lo que significa que los extractos bioactivos encapsulados están ejerciendo su poder antioxidante y previniendo la oxidación lipídica cuando los liposomas son liofilizados. Esta inhibición de la peroxidación lipídica podría ser consecuencia de la combinación de dos mecanismos. Por un lado, por las propiedades antioxidantes intrínsecas de los propios bioactivos y por otro, por sus efectos sobre las propiedades de la membrana mediante la limitación de la penetración de oxígeno en la bicapa lipídica (Tan et al., 2013). Entre liposomas con bioactivos, L-PG fue el que más ($p \leq 0,05$) previno la oxidación (46,6 $\mu\text{g/kg}$), seguido por L-GC (58,5 $\mu\text{g/kg}$) y finalmente L-HC (69,2 $\mu\text{g/kg}$) ($p \leq 0,05$), que si bien son significativos, son valores que se encuentran cercanos. Esto se debe a que los tres extractos bioactivos tienen capacidad antioxidante, siendo la piel de granada debido a sus compuestos polifenólicos (Masci et al., 2016) y la grasa de crustáceo por su contenido en astaxantina y α -tocoferol (Gómez-Estaca et al., 2017) los que más poder antioxidante tienen y mejor previenen la oxidación de los liposomas. Tras la conservación en el tiempo de los liposomas liofilizados, todos disminuyeron significativamente sus valores de malonaldehído tras 3 y 7 meses en congelación, llegando a valores finales muy variables (comprendidos entre 15,5-38,5 $\mu\text{g/kg}$), donde los liposomas vacíos continuaron siendo los más oxidados (38,5 $\mu\text{g/kg}$, $p \leq 0,05$) y los liposomas de grasa de crustáceo los que menos (15,5 $\mu\text{g/kg}$, $p \leq 0,05$), seguidos por los liposomas de piel de granada (23,5 $\mu\text{g/kg}$). Estos resultados podrían ser indicativos de una inestabilidad oxidativa lipídica.

Existe una gran variedad de productos de oxidación de fosfolípidos que son generados durante la peroxidación lipídica de ácidos grasos poliinsaturados (Catalá, 2009) y muchos de ellos son muy reactivos y altamente inestables. La interacción de estos compuestos oxidativos altamente inestables con los fosfolípidos podría explicar el descenso en la cuantificación de malonaldehído, ocasionado por una inestabilidad en la formación y transformación de compuestos de oxidación de unos a otros. La espectroscopía infrarroja (Figura 46) demuestra esta oxidación lipídica de los

liposomas, donde el continuo decremento en la intensidad de la absorbancia para la región entre 3600-3100 cm^{-1} junto con el incremento de la absorbancia y de la amplitud de la banda a 1740 cm^{-1} (marcador de la formación de productos de oxidación lipídica en liposomas, acorde a Lamba et al., 1991) en el tiempo, son indicativos de una descomposición progresiva de los hidroperóxidos para producir aldehídos y cetonas, productos de oxidación secundaria que desencadenan la oxidación lipídica.

Conclusiones

El proceso de liofilización causó cambios estructurales en la membrana de la bicapa que dependen de la naturaleza química del compuesto encapsulado y de su eficacia de encapsulación, ya que ésta se relaciona con la posible localización de los extractos fuera de los liposomas. La encapsulación de varios extractos bioactivos en liposomas no afectó negativamente a la estabilidad mecánica de las pastas de liposomas liofilizados durante su conservación y previno la oxidación lipídica. Los liposomas rellenos con compuestos lipofílicos experimentaron un fuerte efecto de rigidez inducido por calor, el cual debería tenerse en cuenta en alimentos que lleven asociado un tratamiento térmico en su procesado. Los liposomas liofilizados con compuestos bioactivos podrían servir como ingredientes potenciales con una elevada estabilidad de conservación para el diseño de productos alimentarios funcionales con un contenido en agua bajo o intermedio. Para evitar la inestabilidad oxidativa de los liposomas liofilizados, se pueden llevar a cabo varias estrategias, tales como la optimización del proceso de liofilización o la estabilización de la membrana con antioxidantes anfipáticos.

8.3. ENCAPSULACIÓN DE EXTRACTOS ANTIOXIDANTES ACUOSOS Y ETANÓLICOS DE HINOJO MARINO (*CRITHMUM MARITIMUM*) EN LIPOSOMAS DE FOSFATIDILCOLINA DE SOJA LIOFILIZADOS

Resumen

Se elaboraron liposomas de fosfatidilcolina de soja incorporando glicerol y dos extractos antioxidantes (acuoso y etanólico) de hinojo marino (*Crithmum maritimum*), a diferentes concentraciones de bioactivo (8, 16, 32 y 64 %, expresado como proporción de bioactivo con respecto a la cantidad de fosfatidilcolina) y posteriormente se liofilizaron. De ambas preparaciones liposomales (con ambos tipos de extracto) se estudiaron sus propiedades de partícula, dispersabilidad en agua, color, propiedades térmicas y capacidad antioxidante mediante diversos métodos (capacidad de secuestro de radicales libres, poder reductor del hierro y contenido total de fenoles). Ambos extractos de hinojo fueron ricos en ácido clorogénico (42,61 mg/g para el extracto acuoso y 58,48 mg/g para el extracto etanólico) y mostraron una excelente capacidad antioxidante, siendo ésta mayor para el extracto etanólico a mayor concentración de bioactivo. Se detectaron otros compuestos minoritarios que fueron Vitamina C en el extracto acuoso, y rutina y ácido rosmarínico en el extracto etanólico. El proceso de liofilización provocó un incremento del tamaño de partícula y del índice de polidispersidad de todas las dispersiones, mientras que el potencial zeta se volvió más electronegativo, aumentando la estabilidad de membrana. La eficacia de encapsulación de los liposomas varió según la proporción de bioactivo a encapsular. Así, con 64 % de concentración de bioactivo la eficacia de encapsulación fue del 65,6 % y del 49,1 % para los extractos acuoso (L-HM-ac 64) y etanólico (L-HM-et 64), respectivamente, si bien es similar la cantidad de extracto encapsulada en el interior de los liposomas (11,1 % para L-HM-ac 64 y 11,9 % para L-HM-et 64) y lo que les diferencia es la cantidad de extracto adherido a la superficie de los liposomas.

Palabras clave: hinojo marino, ácido clorogénico, fosfatidilcolina de soja, liposomas, liofilización, actividad antioxidante.

Introducción

Las necesidades y preferencias de los consumidores cambian continuamente con el tiempo y actualmente existe una creciente demanda de productos alimentarios funcionales priorizando los beneficios en la salud y prevención de enfermedades frente a los productos de fácil y rápida ingesta. El uso preferencial de compuestos bioactivos saludables a partir de fuentes naturales como ingredientes alimentarios es uno de los objetivos actuales de las industrias de alimentación. Además, el empleo de materias primas residuales o infrautilizadas como fuente de moléculas activas proporciona un alto valor añadido y mejora la sostenibilidad del medio ambiente.

El hinojo marino (*Crithmum maritimum*), también conocido como perejil marino, es una planta halófila comestible muy abundante en las costas del Mar Mediterráneo y del Océano Atlántico. Esta especie es muy rica en compuestos fenólicos con reconocidas y remarcables propiedades antioxidantes (Siracusa et al., 2011), tales como ácido clorogénico (compuesto mayoritario) y ácidos hidroxicinámicos (Nabet et al., 2017). El hinojo marino se considera una planta infrautilizada e infravalorada, cuyo cultivo comercial aún no se ha explotado (Pavela et al., 2017; Renna et al., 2017).

Los compuestos naturales antioxidantes se pueden incluir en el diseño de alimentos funcionales para prevenir enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, tales como enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes o cáncer (Pham-Huy et al., 2008). Sin embargo, su efectividad puede verse afectada por su interacción con los componentes alimentarios o

degradada por el procesamiento industrial. Su encapsulación en liposomas podría ofrecer una solución potencial para mejorar su estabilidad protegiéndolos de condiciones extremas de temperatura o pH, o elevadas concentraciones de iones (Mozafari et al., 2008), y también permitiría una liberación más efectiva del bioactivo en el sitio diana disminuyendo su toxicidad (Sercombe et al., 2015). El efecto de los compuestos fenólicos sobre las propiedades de vesículas y sobre los cambios estructurales de la membrana podría estar influenciado por la composición de fenoles y de fosfolípidos (Popova & Hinch, 2016; Lopes de Azambuja et al., 2015).

Los extractos bioactivos son comúnmente extraídos con solventes orgánicos, ya que este tipo de extracción permite una buena exposición y predisponibilidad de los compuestos bioactivos de un material. Las características y propiedades de los liposomas vienen determinadas por multitud de factores, como son el método y condiciones de elaboración, la composición y proporciones de lípidos empleados en la formulación, la adición y tipos de crioprotectores, etc. (Liu et al., 2010). Uno de los posibles factores determinantes podría ser la cantidad de bioactivo encapsulada.

Objetivos

El segundo objetivo parcial de este capítulo fue el aprovechamiento de una materia prima infrautilizada de bajo coste con excelentes propiedades funcionales para la obtención de un producto alimentario natural y saludable con un alto valor añadido. Para ello se prepararon liposomas de fosfatidilcolina de soja liofilizados, incorporando dos extractos antioxidantes (acuoso y etanólico) procedentes de tallos y hojas de hinojo marino, a diferentes concentraciones de bioactivo, y se caracterizaron sus propiedades hidrodinámicas, estructurales y antioxidantes.

Materiales y métodos

Inicialmente, se extrajo fosfatidilcolina parcialmente purificada de cinco lavados con acetona (FC5) a partir de lecitina de soja (LS), y se obtuvieron los extractos de hinojo marino (acuoso y etanólico).

De ambos extractos se caracterizó el contenido en agua, su contenido proteico total, su composición de compuestos bioactivos principales, su citotoxicidad *in vitro* y su capacidad antioxidante. Además, los extractos (acuoso y etanólico) se trataron de manera similar al procesado que sufre el liposoma y se caracterizaron en términos de composición química y actividad antioxidante.

Los estándares usados para la caracterización de los polifenoles presentes en el hinojo marino fueron: ácido clorogénico, ácido rosmarínico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido siríngico, vitamina C, ácido gálico, ácido elágico, ácido cafeico, punicalagina, quercetina, rutina, epigallocatequina, epigallocatequina-3-galato, epigallocatequina galato, hiperósido y kaempferol-3-O-glucósido.

Seguidamente, se prepararon dispersiones liposomales con fosfatidilcolina (FC5) como material encapsulante y glicerol, encapsulando dos extractos bioactivos (acuoso y etanólico) de hinojo marino, con algunas modificaciones respecto a los de diseños experimentales anteriores. Estas variaciones consistieron en la concentración de bioactivo añadida a la dispersión liposomal, siendo en este caso concentraciones variables: 8, 16, 32 y 64 % para ambos extractos. De este modo, se obtuvieron un total de 8 liposomas: L-HM-ac 8, L-HM-ac 16, L-HM-ac 32, L-HM-ac 64, L-HM-et 8, L-HM-et 16, L-HM-et 32 y L-HM-et 64. De estas dispersiones se analizaron sus características de partícula mediante dispersión dinámica de luz en Zetasizer (dilución 1/10).

Dichas dispersiones se liofilizaron y se estudiaron sus características de partícula mediante dispersión dinámica de luz en Zetasizer (77 mg/mL y posterior dilución 1/10), así como la eficacia de encapsulación, su contenido en agua, dispersabilidad en agua, colorimetría y Calorimetría Diferencial de Barrido (240 mg/mL), y su capacidad antioxidante por los métodos de secuestro de radicales libres (ABTS), capacidad reductora del hierro (FRAP) y contenido de sustancias reactivas al Folin-Ciocalteu.

Resultados y discusión

Caracterización de los extractos

Composición

El perfil cromatográfico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (Figura 50) reveló que el ácido clorogénico es el compuesto fenólico mayoritario en ambos extractos, siendo más abundante en el extracto etanólico (58,48 mg/g) respecto al acuoso (42,61 mg/g).

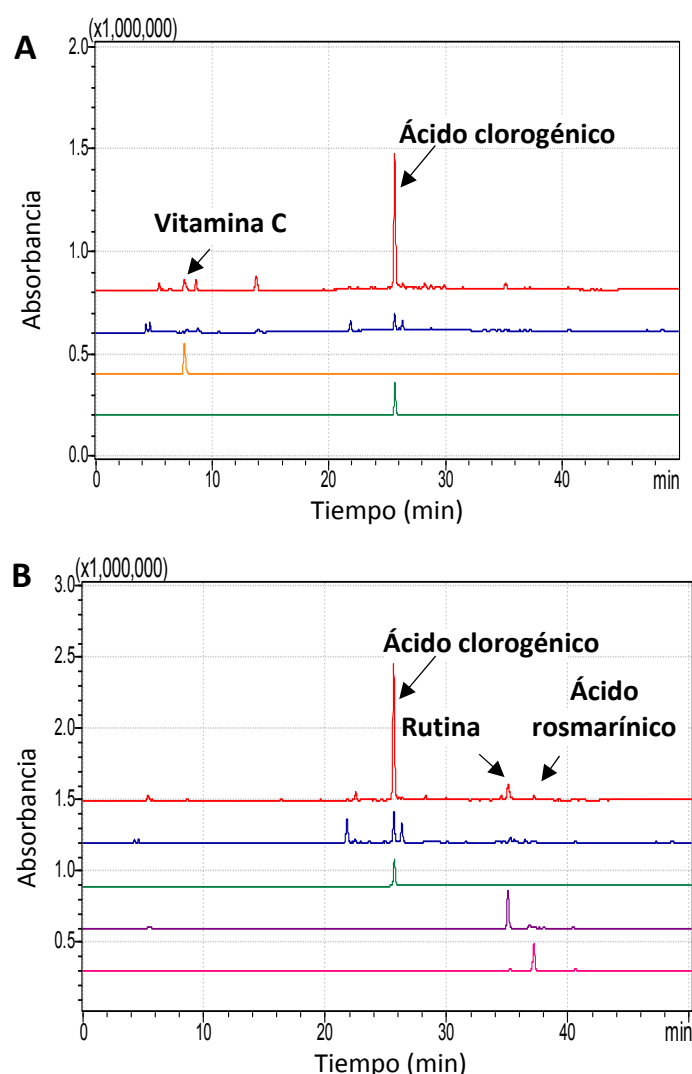


Figura 50. Perfiles cromatográficos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución ($\lambda = 253$ nm) de los extractos de hinojo marino, liposomas y algunos estándares. A) Línea superior: extracto acuoso; segunda línea: liposoma L-HM-ac 64; tercera línea: estándar de Vitamina C; cuarta línea: estándar de ácido clorogénico. B) Línea superior: extracto etanólico; segunda línea: liposoma L-HM-et 64; tercera línea: estándar de ácido clorogénico; cuarta línea: estándar de rutina; quinta línea: estándar de ácido rosmarínico.

Meot-Duros & Magne (2009) determinaron el contenido de ácido clorogénico en extractos metanólicos del hinojo marino que crece en las colinas de arena y debajo de los acantilados y obtuvieron una menor concentración de ácido clorogénico (3-27,9 mg/g), probablemente debido a la ausencia del proceso de sonicación en su protocolo, el cual modifica el proceso de extracción de fenoles.

También se identificaron otros compuestos minoritarios, que variaron su presencia y abundancia relativa en función de la naturaleza del solvente. Así, la vitamina C se cuantificó en el extracto acuoso (1,46 mg/g) mientras que los compuestos rutina (4,52 mg/g) y ácido rosmarínico (2,81 mg/g) se encontraron en el extracto etanólico. Pereira et al. (2017) también determinaron el ácido clorogénico como el compuesto fenólico más abundante presente en extractos de infusiones y decocciones de hojas y tallos de *Crithmum maritimum*. Otros autores reportaron la presencia de ácidos hidroxicinámicos, tales como ácido ferúlico o ácido cumárico, los cuales no se encontraron en los extractos ensayados en la presente memoria.

Ambos extractos de hinojo, con porcentajes de eficacia de extracción del 31 % para el extracto etanólico y del 35,5 % para el extracto acuoso respecto a la planta fresca, presentaron un elevado porcentaje de contenido en agua después de ser liofilizados (>15 %), probablemente debido a su alta higroscopicidad, la cual fue ligeramente superior en el extracto etanólico. A pesar de ello, ambos mostraron una apariencia típica de un polvo fino. El extracto acuoso presentó una coloración marrón-amarillenta con un contenido proteico total del 4,1 %, mientras que el etanólico, con un 2,2 % de proteína total, mostró una coloración verdosa.

Citotoxicidad

La figura 51 muestra la citotoxicidad de ambos extractos de hinojo.

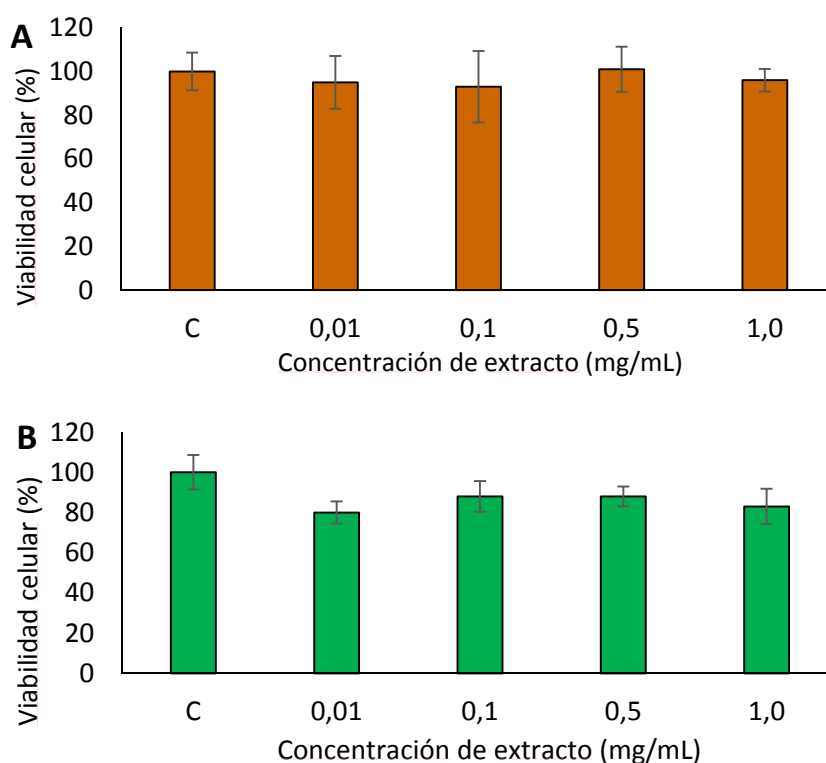


Figura 51. Citotoxicidad en células Caco-2 incubadas 24 h (porcentaje respecto a células control no tratadas, C) de los extractos de hinojo marino a diferentes concentraciones (0,01-1,0 mg/mL). A) Extracto acuoso. B) Extracto etanólico. Los valores representan la media de al menos cuatro determinaciones.

El extracto acuoso (Figura 52A) no presentó efectos citotóxicos significativos ($p \leq 0,05$) en células Caco-2 a las concentraciones testadas. En cambio, se observó una ligera reducción en la viabilidad celular ($p \leq 0,05$) con el extracto etanólico (Figura 52B) independientemente de la concentración de bioactivo, atribuida principalmente a la presencia de etanol residual. Considerando que a la concentración más elevada (1 mg/mL) la viabilidad celular fue superior al 80 %, el posible efecto citotóxico del extracto etanólico fue prácticamente despreciable.

Actividad antioxidante

La actividad antioxidante del extracto etanólico fue superior ($p \leq 0,05$) a la del extracto acuoso para los tres métodos estudiados, con valores de 556,8 y 805,1 mg ácido ascórbico/g muestra en capacidad de secuestrar radicales libres, de 273,6 y 570,8 $\mu\text{mol eq Fe}^{2+}$ /g muestra en poder reductor del hierro, y de 76,0 y 109,0 mg ácido gálico/g muestra en contenido total de fenoles para los extractos acuoso y etanólico, respectivamente. Meot-Duros & Magne (2009) obtuvieron 32 mg ácido gálico/g muestra (contenido total de fenoles por el método de Folin-Ciocalteu) para un extracto de hinojo marino obtenido sin sonicación. Esta menor actividad encontrada por estos autores podría atribuirse a que no aplican sonicación en el proceso de elaboración del extracto, el cual favorece la mayor extracción de compuestos fenólicos, pero también puede haber otros factores como la estacionalidad de la captura, la localización geografía, etc.

Caracterización de los liposomas

Características de partícula

Las características de partícula de las dispersiones liposomales de hinojo se mostraron en la tabla 14. El incremento progresivo en la concentración de bioactivo indujo un aumento ($p \leq 0,05$) del tamaño medio de los liposomas, desde 89,5 hasta 137,1 nm para el extracto acuoso y desde 96,3 nm hasta 150,1 nm para el etanólico. Esta expansión de los liposomas se considera consecuencia del aumento en la concentración de bioactivo, siendo más grande el tamaño a mayor concentración de extracto encapsulado. Frenzel & Steffen-Heins (2015) también observaron un aumento del tamaño de los liposomas a concentraciones crecientes de bioactivo (quercetina) y lo atribuyeron igualmente a un exceso de flavonoles en la bicapa, los cuales no fueron solubles en agua y acabaron formando agregados.

Tabla 14. Características de partícula de tamaño (nm), índice de polidispersidad y potencial zeta (mV) de dispersiones liposomales vacías y cargadas con dos extractos de hinojo marino (acuoso y etanólico) a diferentes concentraciones de bioactivo (8, 16, 32, 64 %). Diferentes letras (a, b, c, d) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre liposomas a diferentes concentraciones del mismo extracto bioactivo; (m, n, o, p, q, r, s) en la misma columna entre todos los liposomas incluyendo ambos extractos y los vacíos (L-V); (x, y) en la misma columna entre liposomas a la misma concentración de bioactivo pero diferente extracto.

| | Tamaño (nm) | Índice de polidispersidad | Potencial Zeta (mV) |
|------------|----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| L-HM-ac 8 | 89,5 \pm 0,9 ^{a/m/x} | 0,316 \pm 0,025 ^{a/mn/x} | -31,8 \pm 1,9 ^{a/m/x} |
| L-HM-ac 16 | 97,3 \pm 0,9 ^{b/n/x} | 0,329 \pm 0,039 ^{a/n/x} | -32,4 \pm 3,7 ^{a/m/x} |
| L-HM-ac 32 | 111,2 \pm 0,8 ^{c/p/x} | 0,345 \pm 0,042 ^{a/n/x} | -36,7 \pm 6,4 ^{a/m/x} |
| L-HM-ac 64 | 137,1 \pm 0,7 ^{d/r/x} | 0,370 \pm 0,018 ^{a/n/x} | -27,7 \pm 2,8 ^{a/m/x} |
| L-HM-et 8 | 96,3 \pm 1,3 ^{a/n/y} | 0,309 \pm 0,027 ^{a/mn/x} | -34,4 \pm 1,1 ^{a/m/y} |
| L-HM-et 16 | 106,0 \pm 1,3 ^{b/o/y} | 0,305 \pm 0,017 ^{a/mn/x} | -33,0 \pm 3,2 ^{a/m/x} |
| L-HM-et 32 | 127,8 \pm 0,2 ^{c/q/y} | 0,295 \pm 0,018 ^{a/mn/x} | -33,1 \pm 3,2 ^{a/m/x} |
| L-HM-et 64 | 150,1 \pm 2,0 ^{d/s/y} | 0,324 \pm 0,044 ^{a/n/x} | -30,1 \pm 2,1 ^{a/m/x} |
| L-V | 87,4 \pm 0,8 ^m | 0,240 \pm 0,005 ^m | -35,5 \pm 1,7 ^m |

Los liposomas que incorporan el extracto etanólico mostraron un tamaño superior ($p \leq 0,05$) a los de extracto acuoso, para una misma concentración. Esta diferencia podría deberse al mayor tamaño molecular de los compuestos fenólicos del extracto etanólico (rutina y ácido rosmarínico) respecto al acuoso (vitamina C) y a su carácter predominantemente lipofílico (frente a la naturaleza hidrofílica del extracto acuoso), el cual determina su mayor afinidad por las cadenas acilo de los fosfolípidos de la bicapa (zona hidrofóbica). Esta acumulación de compuestos fenólicos en la parte hidrofóbica de la membrana puede ocasionar alteraciones en las interacciones entre las cadenas acilo de los fosfolípidos, induciendo un efecto de hinchamiento de la bicapa (Sebaaly et al., 2015).

Acorde a estos resultados, los liposomas L-HM-ac 8 fueron los que presentaron un menor tamaño medio con un valor de 89,5 nm, siendo los liposomas que contienen el extracto acuoso a menor concentración, mientras que los liposomas L-HM-et 64 fueron los que presentaron un significativo mayor tamaño medio con 150,1 nm (conteniendo extracto etanólico a mayor concentración). Feng et al. (2016) obtuvieron similares resultados para liposomas de soja conteniendo ácido clorogénico extraído en etanol (132,1 nm). Los liposomas vacíos (L-V) mostraron un tamaño medio de 87,4 nm, valor significativamente inferior a cualquiera de las dispersiones liposomales con bioactivo, excepto L-HM-ac 8 (89,5 nm) que es el que tiene menor contenido en bioactivo, demostrando nuevamente el efecto expansor del bioactivo dentro de los liposomas.

El índice de polidispersidad no mostró diferencias significativas entre dispersiones de hinojo, oscilando los valores entre 0,295-0,370. Estos resultados se confirmaron en la gráfica de distribución de tamaños (Figura 52), la cual no mostró diferencias entre dispersiones.

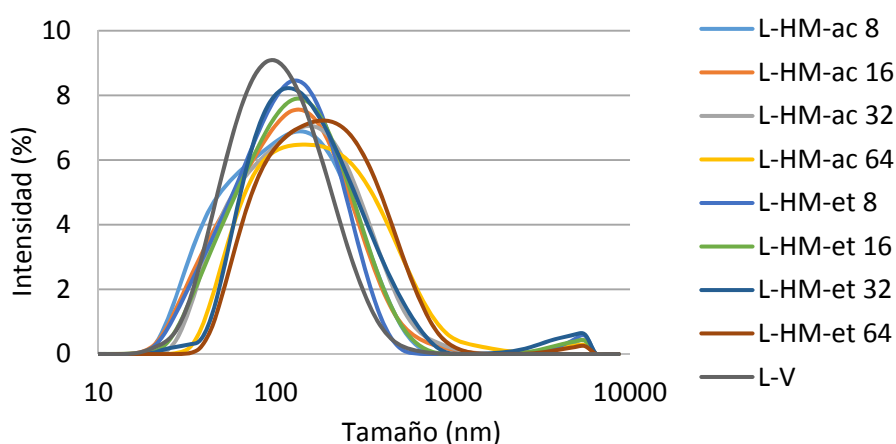


Figura 52. Distribución de tamaños de partícula de dispersiones liposomales vacías y cargadas con dos extractos (acuoso y etanólico) de hinojo marino a diferentes concentraciones de bioactivo (8, 16, 32, 64 %).

Aun así se pueden apreciar algunos patrones en función del tipo de extracto y de la concentración de bioactivo. Para los liposomas con extracto acuoso se observa un incremento de la polidispersidad con el aumento de la concentración de bioactivo incorporado en los liposomas, indicando que más cantidad de bioactivo provoca una mayor heterogeneidad de tamaños. Sin embargo esta pauta no se cumple para los de extracto etanólico cuyos valores fluctúan sin proporcionalidad con la concentración. Además, los valores de polidispersidad fueron menores para los liposomas etanólicos que para los acuosos cuando se comparan a igual concentración de bioactivo. Estos resultados indican que los liposomas etanólicos mantienen un rango de distribución de tamaños más estrecho y homogéneo y son más estables frente al incremento de la concentración de bioactivo. Los liposomas vacíos (L-V) presentaron un valor de polidispersidad ligeramente inferior al de los liposomas rellenos (0,240). Los valores de

polidispersidad de las dispersiones estuvieron en el rango esperado para sistemas preparados a partir de material biológico (Da Silva Malheiros et al., 2011).

El potencial zeta, que representa la carga neta de los liposomas y por tanto su grado de estabilidad de membrana, fue significativamente igual ($p > 0,05$) para todas las dispersiones liposomales de hinojo, sin relación en función del tipo de extracto o de su concentración. Estos valores oscilaron entre -27,7 mV y -36,7 mV, todos ellos muy electronegativos y, acorde a Müller et al. (2001), indicativos de una buena estabilidad de membrana al ser inferiores a -30 mV. Tampoco presentaron diferencias ($p > 0,05$) con los liposomas vacíos (-35,5 mV). Dag & Oztop (2017) obtuvieron similares resultados para liposomas de lecitina encapsulando extracto polifenólico de té verde, con un potencial zeta estable de -30 mV.

En la tabla 15 se muestran las características de partícula de los liposomas de hinojo liofilizados. El proceso de liofilización provoca un incremento notable ($p \leq 0,05$) del potencial zeta, volviéndolo más electronegativo (de -34,2 a -48,2 mV) y mejorando así la estabilidad de membrana de los liposomas. Sin embargo, también induce un ligero incremento del índice de polidispersidad (0,332-0,430) y un aumento considerable ($p \leq 0,05$) del tamaño medio (171,1-311,4 nm).

Tabla 15. Características de partícula de tamaño (nm), índice de polidispersidad y potencial zeta (mV) de liposomas liofilizados vacíos y cargados con dos extractos de hinojo marino (acuoso y etanólico) a diferentes concentraciones de bioactivo (8, 16, 32, 64 %). Diferentes letras (a, b, c, d) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre liposomas a diferentes concentraciones del mismo extracto bioactivo; (m, n, o, p, q) en la misma columna entre todos los liposomas incluyendo ambos extractos y los vacíos (L-V); (x, y) entre liposomas a la misma concentración de bioactivo pero diferente extracto.

| | Tamaño (nm) | Índice de polidispersidad | Potencial Zeta (mV) |
|------------|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| L-HM-ac 8 | 171,1 ± 1,6 ^{a/m/x} | 0,341 ± 0,004 ^{a/m/x} | -46,1 ± 1,1 ^{a/no/x} |
| L-HM-ac 16 | 249,4 ± 4,0 ^{c/p/x} | 0,430 ± 0,010 ^{b/m/x} | -44,6 ± 1,3 ^{a/o/x} |
| L-HM-ac 32 | 230,2 ± 1,0 ^{b/o/x} | 0,332 ± 0,046 ^{a/m/x} | -40,0 ± 1,3 ^{b/p/x} |
| L-HM-ac 64 | 311,4 ± 4,4 ^{d/q/x} | 0,378 ± 0,025 ^{ab/m/x} | -34,2 ± 0,9 ^{c/q/x} |
| L-HM-et 8 | 225,4 ± 1,8 ^{a/no/y} | 0,388 ± 0,067 ^{a/m/x} | -47,3 ± 1,2 ^{a/no/y} |
| L-HM-et 16 | 219,3 ± 6,1 ^{a/n/y} | 0,371 ± 0,046 ^{a/m/x} | -48,2 ± 1,1 ^{a/n/x} |
| L-HM-et 32 | 225,1 ± 4,5 ^{a/no/x} | 0,364 ± 0,039 ^{a/m/x} | -40,3 ± 2,3 ^{b/p/x} |
| L-HM-et 64 | 216,4 ± 2,1 ^{a/n/y} | 0,377 ± 0,010 ^{a/m/x} | -37,5 ± 0,5 ^{b/p/y} |
| L-V | 316,6 ± 6,7 ^q | 0,374 ± 0,081 ^m | -54,2 ± 1,5 ^m |

Mientras que el índice de polidispersidad no siguió ninguna pauta en función del extracto o de su concentración (Figura 53), sí lo hicieron el potencial zeta y el tamaño. El potencial zeta fue más electronegativo ($p \leq 0,05$) a menores concentraciones de bioactivo, sin diferencias significativas entre las concentraciones de 8 % y 16 %. Estos resultados indican que los liposomas con menor concentración de bioactivo fueron más estables (siendo todos ellos muy estables ya que fueron inferiores a -30 mV), posiblemente debido a que la menor cantidad de bioactivo encapsulado interfiere en menor medida con la cápsula y afecta menos a la conformación y estabilidad física de los liposomas. Esta afirmación la confirma la elevada carga electronegativa del liposoma vacío (-54,2 mV), siendo más electronegativa que el resto de liposomas con bioactivos. El potencial fue ligeramente más electronegativo y más estable (solo significativo a concentraciones de 8 % y 64 %) en los liposomas con extracto etanólico en comparación con sus correspondientes concentraciones de extracto acuoso, lo que significa que el extracto etanólico proporciona mayor estabilidad de membrana que el acuoso. Este resultado se confirma

analizando el potencial zeta de cada extracto, siendo más electronegativo para el etanólico (-17,1 mV) que para el acuoso (-14,8 mV).

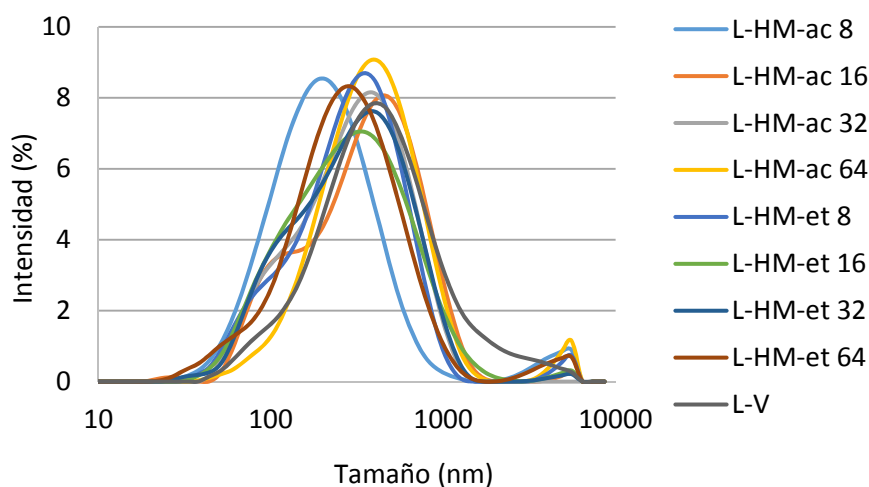


Figura 53. Distribución de tamaños de partícula de liposomas liofilizados vacíos y cargados con dos extractos (acuoso y etanólico) de hinojo marino a diferentes concentraciones de bioactivo (8, 16, 32, 64 %).

El tamaño medio aumentó a cantidades crecientes de bioactivo acuoso hasta un valor de 311,4 nm para L-HM-ac 64, siendo éstos los liposomas de hinojo de mayor tamaño. Sin embargo, para los liposomas con extracto etanólico no se observó ninguna relación con la concentración de bioactivo, con tamaños comprendidos en un estrecho rango de valores, de 216,4 nm a 225,4 nm. Por la misma razón, no hubo tampoco relación aparente entre extractos para una misma concentración. Estos resultados indican presuntamente que da igual la concentración de bioactivo etanólico que se encapsule, ya que su tamaño será más o menos el mismo, hecho que no sucede con el extracto acuoso. Por tanto, la concentración de bioactivo no parece determinante en esta propiedad de partícula de los liposomas.

Eficacia de encapsulación

Se estudió la eficacia de encapsulación de los liposomas liofilizados de hinojo a concentraciones de 64 % de bioactivo (L-HM-ac 64 y L-HM-et 64). Para L-HM-ac 64, la proporción de sustancias libres reactivas al Folin (no encapsuladas) con respecto a la cantidad total determinada después de romper la membrana de los liposomas con Tritón X-100 fue del 34,4 %, lo que significa que un 65,6 % de los compuestos de extracto acuoso se atraparon en liposomas. Al comparar la cantidad de sustancias reactivas al Folin medida en la suspensión liposomal, L-HM-ac 64 antes y después del tratamiento con Tritón X-100, se observa un aumento de 11,1 % en este último, lo cual es atribuido a la cantidad de sustancias reactivas al Folin en las vesículas rotas. Según estos resultados, solo se incluiría un 11,1 % de extracto en el núcleo interno de los liposomas, mientras que el restante 54,5 % (hasta completar el 65,6 %) permanecería asociado a la membrana (incrustado dentro de las cadenas de acilo o adsorbido a la superficie de la membrana interactuando con los grupos de fosfato polares). En el caso del sistema liposomal con extracto etanólico (L-HM-et 64) y siguiendo este mismo enfoque, la eficacia de encapsulación fue menor (49,1 %), lo cual es indicativo de que deben existir sustancias polifenólicas en la solución liposomal. El valor de sustancias reactivas al Folin liberado tras la rotura de los liposomas fue idéntico al obtenido para los liposomas L-HM-ac 64 (11,9 %). Por tanto, el contenido de extracto bioactivo asociado a la membrana externa liposomal y/o a las moléculas que sobresalen al exterior fue inferior a la de los liposomas acuosos (37,2 %). Feng et al. (2016) obtuvieron

similares resultados de eficacia de encapsulación para liposomas incorporando ácido clorogénico (53,1 %).

La diferencia de encapsulación entre extractos se debe a diversos factores, tales como a la diferente distribución de sus compuestos fenólicos en los liposomas, la cual es determinada por su distinto tamaño molecular y diferente solubilidad en agua. Así, en el extracto acuoso la elevada cantidad de vitamina C, que es completamente soluble en agua, tendría tendencia a ubicarse en el núcleo acuoso, de forma que la menor concentración de ácido clorogénico se empaquetaría fácilmente dentro de las cadenas acilo de ácidos grasos de la bicapa. En el caso del extracto etanólico, la mayor concentración de clorogénico junto con otros compuestos fenólicos de elevado peso molecular (rutina y ácido rosmarínico) podrían dificultar su completo empaquetamiento dentro de la bicapa, y por tanto parte de este extracto no es encapsulado, dando lugar a una menor eficacia de encapsulación.

Los perfiles cromatográficos de Cromatografía Líquida de Alta Resolución, tanto de los extractos como de los liposomas (Figura 54), confirmaron los resultados anteriores.

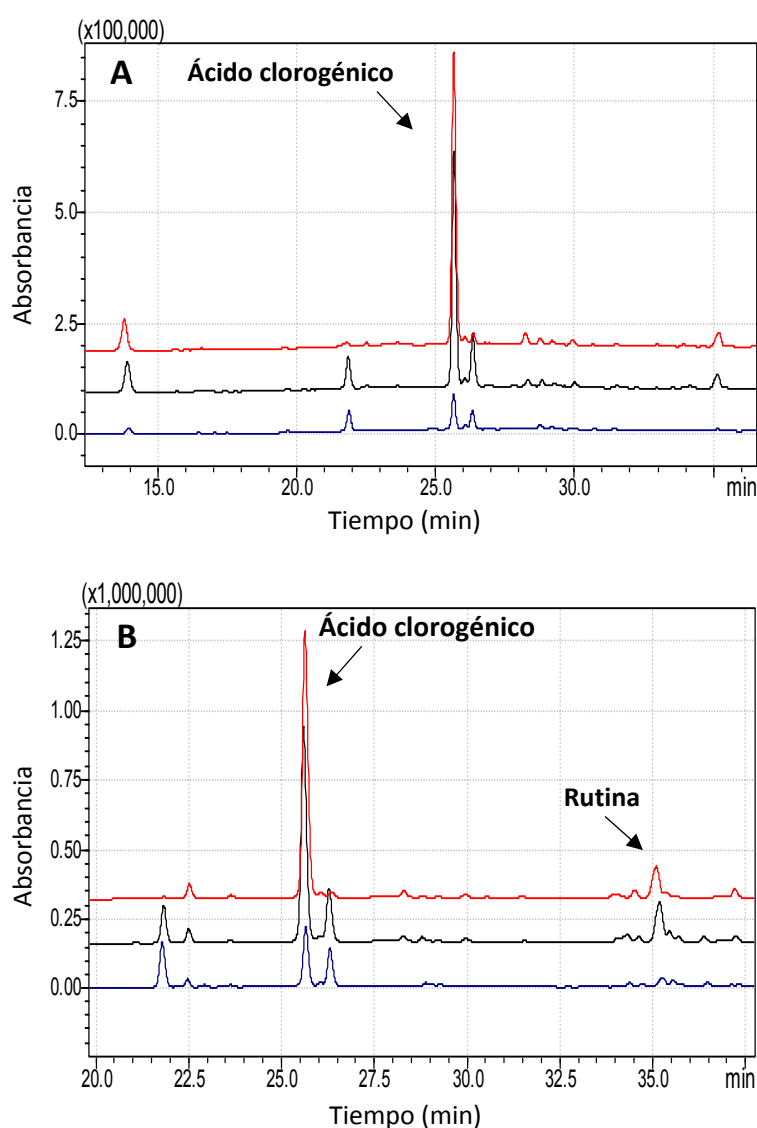


Figura 54. Perfiles cromatográficos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución ($\lambda = 253$ nm) de los extractos de hinojo marino y sus liposomas. A) Línea superior: extracto acuoso; segunda línea: extracto acuoso calentado a 80 °C (2 h) y sonicado; tercera línea: liposoma L-HM-ac 64. B) Línea superior: extracto etanólico; segunda línea: extracto etanólico calentado a 80 °C (2 h) y sonicado; tercera línea: liposoma L-HM-et 64.

Los picos asociados al ácido clorogénico en los extractos (42,61 y 58,48 mg/g para el acuoso y el etanólico, respectivamente) se vieron notablemente reducidos en los liposomas (13,67 y 20,05 mg/g para el acuoso y el etanólico, respectivamente), lo que sugiere que esta menor cantidad detectada en los liposomas corresponde a la fracción no atrapada mientras que el resto ha sido eficientemente encapsulado y por eso no es detectado. Esto demuestra una eficiente encapsulación del ácido clorogénico en ambos extractos, siendo ésta del 67,92 % para los liposomas acuosos y del 65,72 % para los liposomas etanólicos.

Se observaron similares resultados para los picos asociados a la vitamina C en el extracto acuoso y para la rutina y ácido rosmarínico en el etanólico, indicativos de su buena encapsulación. Estos resultados concuerdan con los obtenidos anteriormente mediante el método de Folin. Las pequeñas diferencias de eficacia de encapsulación entre ambas técnicas podrían atribuirse a las propiedades moleculares y químicas de cada compuesto específico, así como a posibles interferencias con otros compuestos reactivos en el método de Folin.

Los cromatogramas también mostraron el incremento en abundancia relativa de algunos compuestos minoritarios no identificados o incluso la aparición de otros nuevos, localizados en la parte no encapsulada. Estos compuestos podrían ser el resultado de la degradación térmica o transformación de fenoles, incluido el ácido clorogénico, durante el proceso de preparación de liposomas, como se deduce de la comparación con los extractos de hinojo calentados y sonicados a las mismas condiciones que los liposomas (Figura 54). La altura del pico del ácido clorogénico disminuyó ligeramente en los extractos procesados, sin embargo, el decremento fue menos evidente que en las suspensiones liposomales. Por tanto, se puede asumir que, aunque podría estar teniendo lugar parte de degradación térmica, la mayoría del extracto fue encapsulada.

La cantidad de ácido clorogénico no encapsulada determinada en las dispersiones liposomales fue considerablemente menor que la de sus correspondientes extractos acuoso y etanólico (Tabla 16).

Tabla 16. Concentración de ácido clorogénico en los extractos de hinojo marino acuoso (Ext Ac) y etanólico (Ext Et), antes y después de ser calentados y sonicados (*), y en la fracción no encapsulada de sus correspondientes dispersiones liposomales (L-HM-ac 64 y L-HM-et 64).

| | Ácido clorogénico (mg/g) |
|------------|-----------------------------|
| Ext Ac | 42,61 ± 0,94 |
| Ext Ac* | 38,31 ± 1,22 |
| L-HM-ac 64 | 13,67 ± 0,34 |
| Ext Et | 58,48 ± 1,01 |
| Ext Et* | 49,94 ± 1,46 |
| L-HM-et 64 | 20,05 ± 0,57 |

Además, la disminución de ácido clorogénico como consecuencia de los procesos de calentamiento y sonicación de los extractos fue del 10 % para el extracto acuoso y del 15 % para el etanólico. Teniendo en cuenta la degradación térmica de este compuesto durante la preparación del liposoma, la cantidad de ácido clorogénico encapsulada sería del 64,3 % y del 59,8 % para L-HM-ac 64 y L-HM-et 64, respectivamente; lo que indica que el ácido clorogénico en el extracto acuoso fue más eficientemente encapsulado que el extracto etanólico. Estos resultados concuerdan con la menor eficacia de encapsulación determinada por el método Folin del extracto etanólico (49,1 %) respecto al acuoso (65,6 %). Las diferencias en la tasa de

encapsulación se explican, tanto para el método Folin como para la concentración de ácido clorogénico, por las propiedades químicas y moleculares de cada compuesto específico del extracto así como por posibles interferencias de otros compuestos reactivos al Folin.

Color

Los parámetros de color de cromaticidad y tonalidad de los liposomas liofilizados de hinojo se mostraron en la figura 55. Sus valores para el parámetro de luminosidad (L^* , 0-100) se mostraron en la tabla 17.

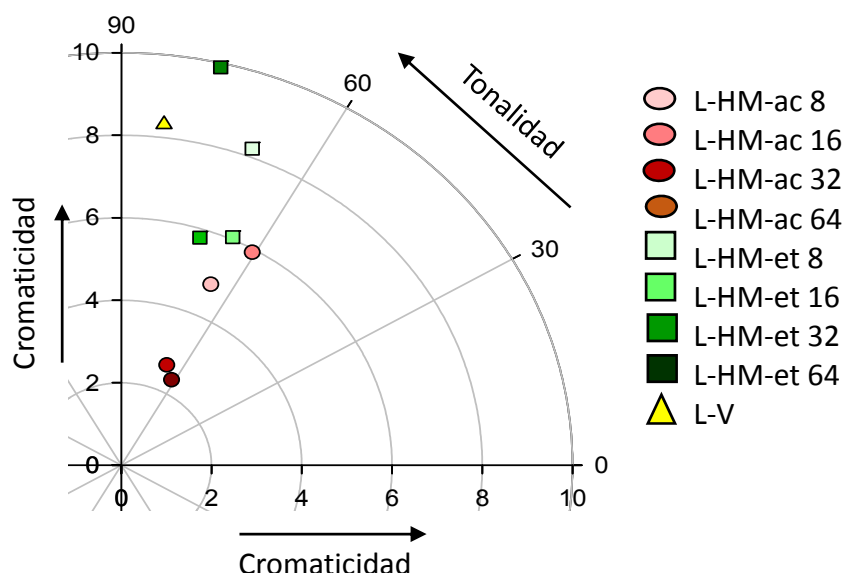


Figura 55. Gráfico representando los parámetros de color cromaticidad y tonalidad de liposomas liofilizados vacíos y cargados con dos extractos (acuoso y etanólico) de hinojo marino a diferentes concentraciones de bioactivo (8, 16, 32, 64 %).

Los liposomas etanólicos presentaron mayores valores de cromaticidad (5,8-9,9) y tonalidad (66,0-77,1) ($p \leq 0,05$) que sus respectivos liposomas acuosos (2,4-5,9 y 60,7-67,4, respectivamente). Igualmente, los liposomas etanólicos mostraron valores de luminosidad ligeramente superiores ($p \leq 0,05$) (29,3-32,1) que sus respectivos acuosos (27,1-29,0).

Tabla 17. Parámetro de color luminosidad (L^* , 0-100) de liposomas liofilizados vacíos y cargados con dos extractos (acuoso y etanólico) de hinojo marino a diferentes concentraciones de bioactivo (8, 16, 32, 64 %). Diferentes letras (a, b, c, d) indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre liposomas a diferentes concentraciones del mismo extracto bioactivo; (m, n, o, p, q, r, s) entre todos los liposomas incluyendo ambos extractos y los vacíos (L-V); (x, y) entre liposomas a la misma concentración de bioactivo pero diferente extracto.

| | L^* (D65) |
|------------|------------------------|
| L-HM-ac 8 | $29,0 \pm 0,1^{c/o/x}$ |
| L-HM-ac 16 | $29,0 \pm 0,1^{c/o/x}$ |
| L-HM-ac 32 | $28,0 \pm 0,2^{b/n/x}$ |
| L-HM-ac 64 | $27,1 \pm 0,1^{a/m/x}$ |
| L-HM-et 8 | $30,9 \pm 0,3^{c/q/y}$ |
| L-HM-et 16 | $29,3 \pm 0,5^{a/o/x}$ |
| L-HM-et 32 | $30,2 \pm 0,4^{b/p/y}$ |
| L-HM-et 64 | $32,1 \pm 0,2^{d/r/y}$ |
| L-V | $32,5 \pm 0,2^s$ |

Todos estos valores fueron menores que los observados para los liposomas vacíos, con un valor de cromaticidad de 8,3; tonalidad de 83,5; y L^* de 32,5 (a excepción de L-HM-et 64 que superó el valor de cromaticidad con un 9,9), lo que significa que estas diferencias en los liposomas etanólicos y acuosos son consecuencia de la diferente coloración de los propios extractos, verdosa para el etanólico y marrón-amarillenta para el acuoso (Figura 56).

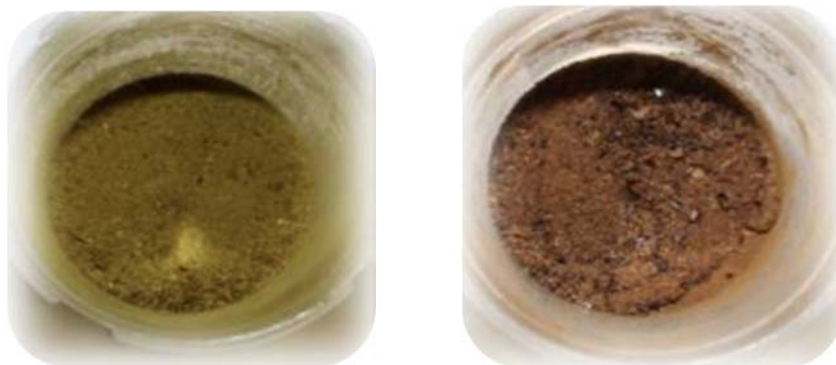


Figura 56. Extractos etanólico (izquierda) y acuoso (derecha) de hinojo marino.

La coloración vendría en buena parte aportada por la parte de extracto no encapsulada o la que está adherida a la membrana externa de los liposomas. Los liposomas con cantidades crecientes de bioactivo no siguen ninguna proporcionalidad definida, ni los acuosos ni los etanólicos, para ninguno de los parámetros estudiados (cromaticidad, tonalidad y luminosidad). Esto indica que la concentración de extractos bioactivos no es el factor determinante en la coloración de los liposomas liofilizados de hinojo.

Contenido en agua

El contenido en agua de los liposomas liofilizados de hinojo (Tabla 18) no mostró relación en función del tipo de extracto (acuoso o etanólico) o de la concentración de bioactivo (8, 16, 32 o 64 %), pero todos los valores fueron considerablemente altos, comprendidos entre 14,8-38,1 %. Este elevado contenido en agua se debe a la presencia del glicerol en sus formulaciones, el cual mejora la estabilidad de las vesículas (Mozafari, 2005) y previene los daños contra la congelación y liofilización (Stark et al., 2010) pero interfiere en la estructura de la membrana lipídica, disminuyendo la cantidad de agua eliminada y aumentando el estado de hidratación de los liposomas (Manca et al., 2013) debido a su naturaleza higroscópica. Con excepción de L-HM-ac 32, todos los liposomas liofilizados conteniendo extracto bioactivo tuvieron un mayor contenido en agua que los liposomas vacíos (18,5 %), lo que podría sugerir que una determinada cantidad de compuestos fenólicos del extracto permanece fuera de los liposomas (ya sea no encapsulado o adherido a la membrana externa de los mismos) aumentando la higroscopicidad y por tanto el contenido en agua.

Dispersabilidad en agua

La dispersabilidad en agua de los liposomas liofilizados de hinojo (Tabla 18), que igualmente parece no presentar pauta según la concentración o el tipo de bioactivo, fue también muy elevada en todos los liposomas, siendo $\geq 79,9$ %, indicando su buena predisposición a ser incorporados en el organismo. Los liposomas con una dispersabilidad significativamente mayor ($p \leq 0,05$) fueron L-HM-et 64 con un valor del 100 %. Estos valores fueron superiores al mostrado por los liposomas vacíos (73,6 %), lo que, junto con el menor incremento del tamaño de partícula observado en Zetasizer de los liposomas rellenos frente al vacío cuando éstos son liofilizados, podría demostrar que la presencia de los compuestos fenólicos en los liposomas atenúa el efecto

de agregación de los mismos provocado por el proceso de liofilización, dando lugar a un menor tamaño de partícula y una mayor dispersabilidad en agua en los liposomas con hinojo.

Tabla 18. Contenido en agua (%) y dispersabilidad en agua (%) de liposomas liofilizados vacíos y cargados con dos extractos de hinojo marino (acuoso y etanólico) a diferentes concentraciones de bioactivo (8, 16, 32, 64 %). Diferentes letras (a, b, c, d) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre liposomas a diferentes concentraciones del mismo extracto bioactivo; (m, n, o, p, q) en la misma columna entre todos los liposomas incluyendo ambos extractos y los vacíos; (x, y) en la misma columna entre liposomas a la misma concentración de bioactivo pero diferente extracto.

| | Contenido en agua (%) | Dispersabilidad (%) |
|------------|--------------------------|--------------------------|
| L-HM-ac 8 | $38,1 \pm 0,6^{d/q/x}$ | $86,4 \pm 6,8^{a/n/x}$ |
| L-HM-ac 16 | $30,5 \pm 1,4^{c/p/x}$ | $91,6 \pm 1,4^{a/no/x}$ |
| L-HM-ac 32 | $14,8 \pm 1,9^{a/m/x}$ | $82,4 \pm 2,7^{a/mn/x}$ |
| L-HM-ac 64 | $20,9 \pm 1,2^{b/n/x}$ | $81,4 \pm 4,7^{a/mn/x}$ |
| L-HM-et 8 | $27,0 \pm 0,8^{ab/op/y}$ | $79,9 \pm 2,5^{a/mn/x}$ |
| L-HM-et 16 | $37,4 \pm 2,5^{c/q/x}$ | $88,2 \pm 1,8^{b/n/x}$ |
| L-HM-et 32 | $22,8 \pm 1,2^{a/no/y}$ | $82,5 \pm 1,2^{ab/mn/x}$ |
| L-HM-et 64 | $31,1 \pm 2,6^{bc/p/x}$ | $100,0 \pm 0,0^{c/o/x}$ |
| L-V | $18,5 \pm 2,2^{mn}$ | $73,6 \pm 2,6^m$ |

Calorimetría Diferencial de Barrido

Las propiedades térmicas de los liposomas liofilizados de hinojo analizadas mediante Calorimetría Diferencial de Barrido se mostraron en la figura 57. Todos los liposomas presentaron una única transición de fase endotérmica difusa debido a la eliminación de parte del agua de la muestra mediante el proceso de liofilización, lo que dificulta su correcta visualización. Por esta razón, los valores de entalpía asociados a los picos de estas transiciones endotérmicas no se mostraron, ya que fueron valores muy pequeños e imprecisos (<1 J/g). Sin embargo, sí se muestran los valores de temperatura asociados a estos picos, comprendidos entre 0,97-5,34 °C. Este bajo rango de temperaturas es típico de termogramas de liposomas elaborados a partir de fosfatidilcolina de soja rica en ácidos grasos poliinsaturados (Biltonen & Lichtenberg, 1993).

Un incremento del pico de temperatura se observó con el aumento de la concentración de bioactivo en ambos extractos, así como mayores temperaturas para los liposomas etanólicos (Figura 57B) frente a sus respectivos liposomas acuosos (Figura 57A). La mayor temperatura en los liposomas etanólicos podría ser debida a la mayor cantidad de compuestos lipofílicos embebidos en la membrana, dada la naturaleza de los extractos. Estos compuestos lipofílicos interaccionan con la membrana y son los responsables de sus cambios estructurales, aportándole una mayor estabilidad. Por otro lado, cantidades crecientes de bioactivo también aportan una mayor rigidez y estabilidad a la membrana, siendo los liposomas L-HM-et 64 los de mayor estabilidad, ya que el bioactivo, independientemente de su naturaleza, interfiere con la membrana lipídica e induce un efecto de compactación/agregación que mejora la estabilidad de membrana.

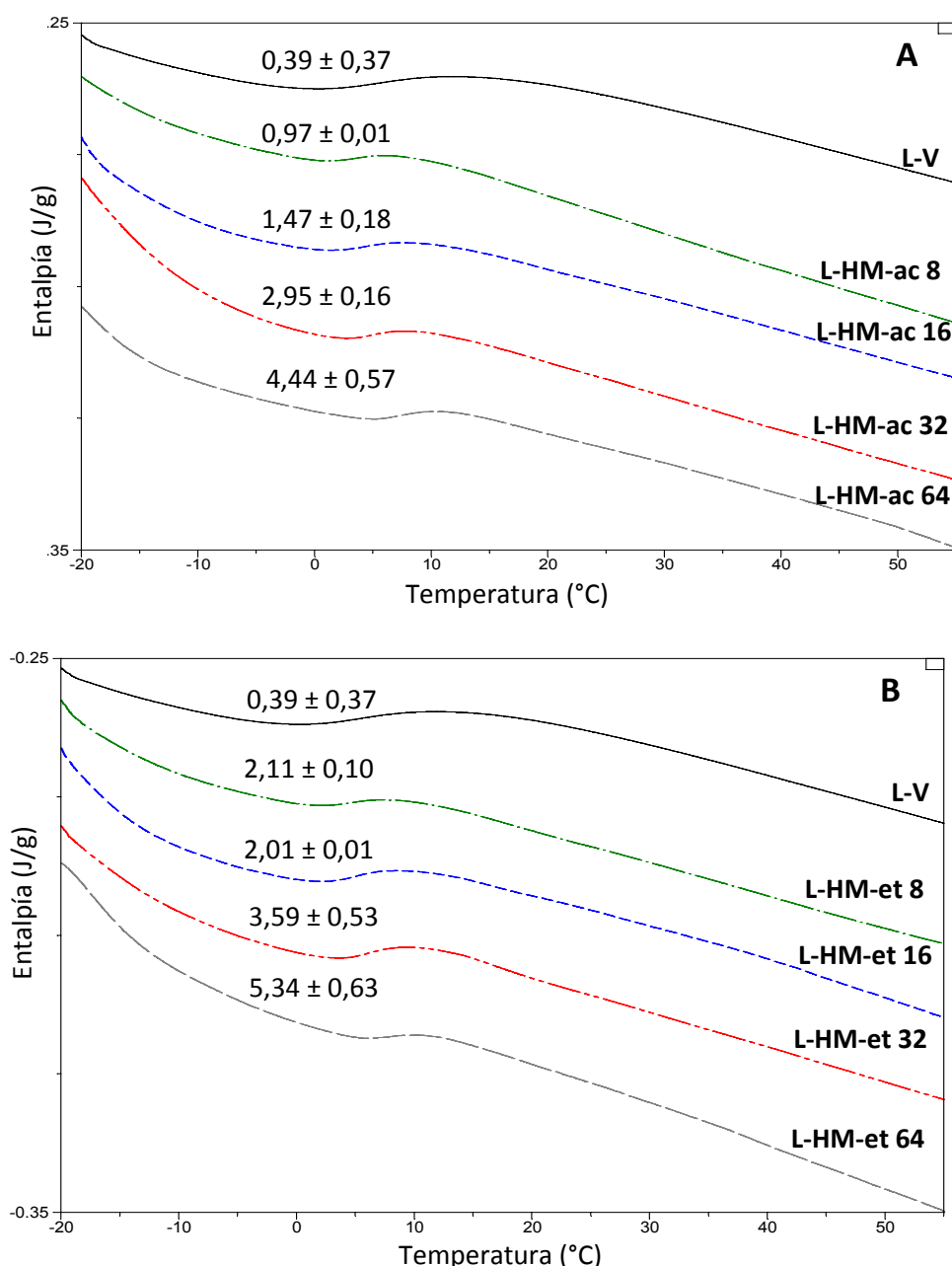


Figura 57. Cambios de temperatura (T , °C) y entalpía (ΔH , J/g) de las transiciones de fase analizados mediante Calorimetría Diferencial de Barrido de liposomas liofilizados vacíos y cargados con dos extractos de hinojo marino (acuoso y etanólico) a diferentes concentraciones de bioactivo (8, 16, 32, 64 %). A) Liposomas acuosos. B) Liposomas etanólicos.

Rashidinejad et al. (2014) obtuvieron similares conclusiones tras la adición de catequina o epigallocatequina galato en liposomas de fosfatidilcolina de soja. Sin embargo, Pagnussatt et al. (2016) y Ota et al. (2011) observaron un descenso de 1,5 °C cuando se incorporó un extracto fenólico a partir de *Spirulina sp.* en liposomas de 1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina y un decremento progresivo de la temperatura con cantidades crecientes de compuestos fenólicos encapsulados en liposomas a partir de fosfolípidos sintéticos, respectivamente. Estos resultados sugieren que las transiciones endotérmicas de los liposomas dependen del tipo de extracto bioactivo encapsulado, el cual determina las temperaturas de los picos de transición y la estabilidad de membrana en función de sus diferentes interacciones con la bicapa. También puede ser un factor determinante la composición del fosfolípido, en especial en función del grado de insaturación y longitud de las cadenas de los ácidos grasos. Todos los liposomas de

hinojo tuvieron una mayor temperatura de transición de fase que los liposomas vacíos (0,39 °C), confirmando que el extracto bioactivo interacciona con la bicapa y mejora su estabilidad de membrana.

Actividad antioxidante

Se cuantificó la actividad antioxidante de todos los liposomas liofilizados de hinojo (Figura 58).

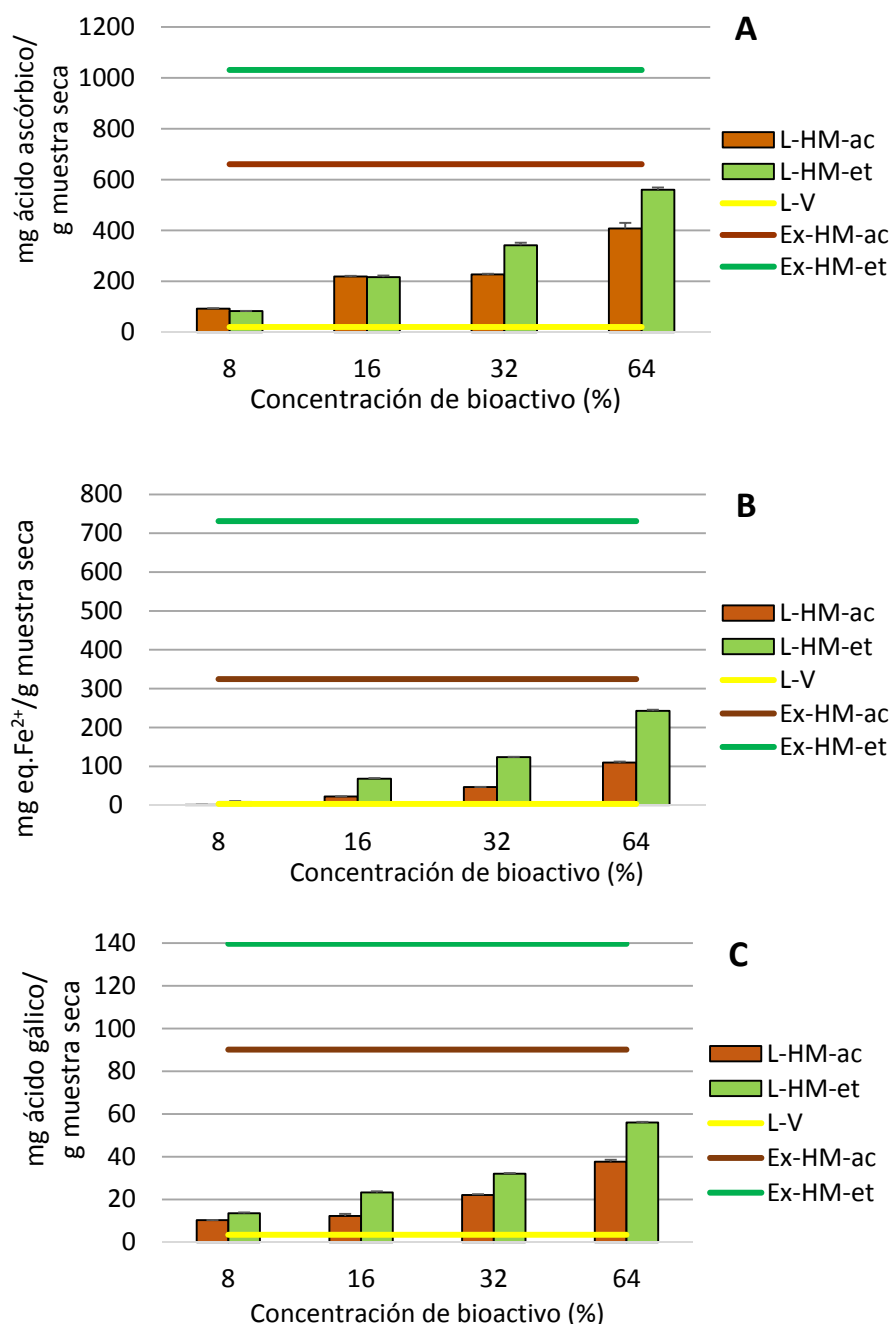


Figura 58. Actividades antioxidantes de los extractos de hinojo marino (acuoso y etanólico) y de liposomas liofilizados vacíos y cargados con los dos extractos de hinojo marino a diferentes concentraciones de bioactivo, donde Ex-HM-ac: extracto acuoso; Ex-HM-et: extracto etanólico; L-V: liposomas vacíos; L-HM-ac: liposomas cargados con extracto acuoso; L-HM-et: liposomas cargados con extracto etanólico. A) Método de capacidad de secuestro de radicales libres (reactivo ABTS), expresado como mg ácido ascórbico/g muestra seca. B) Método de capacidad de reducir el hierro, expresado como mg eq. Fe²⁺/g muestra seca. C) Método de contenido total de fenoles (reactivo Folin-Ciocalteu), expresado como mg ácido gálico/g muestra seca.

Los resultados de actividad antioxidante siguieron exactamente el mismo patrón para las tres técnicas ensayadas: capacidad de secuestrar radicales libres (reactivo ABTS) (Figura 58A), poder reductor del hierro (Figura 58B) y contenido total de fenoles determinado como medida de sustancias reactivas al Folin-Ciocalteu (Figura 58C), por lo que serán explicadas conjuntamente.

Todos los liposomas rellenos mostraron una actividad antioxidante superior ($p \leq 0,05$) a la de los liposomas vacíos (la única excepción fueron los liposomas L-HM-ac 8 para la técnica de reducción del hierro), la cual fue muy pequeña (20,0 mg ácido ascórbico, 2,8 mg eq. Fe^{2+} y 3,4 mg ácido gálico/g muestra). Puesto que los liposomas no se rompieron intencionadamente, la actividad antioxidante cuantificada corresponde con los componentes no encapsulados o aquellos que interaccionan con la superficie de membrana a través de los grupos polares fosfato. La actividad de los extractos fue muchísimo mayor ($p \leq 0,05$) que la de los liposomas, confirmando que solo se está detectando una parte del extracto en los liposomas.

La actividad antioxidante de los liposomas y el contenido total de fenoles siguieron una tendencia lineal creciente ($R^2 > 0,90$) como resultado del incremento en la concentración de bioactivo, independientemente del tipo de extracto. Con excepción de los liposomas acuosos a una concentración del 8 % y 16 % para el método ABTS, todos los liposomas etanólicos, independientemente de la concentración de bioactivo, mostraron mayor actividad ($p \leq 0,05$) que los liposomas acuosos para los tres métodos antioxidantes. Del mismo modo, la actividad aumentó progresivamente con el incremento gradual de la concentración de extracto bioactivo, siendo los liposomas L-HM-et 64 los de mayor actividad para las tres técnicas (559,8 mg ácido ascórbico, 242,9 mg eq. Fe^{2+} y 56,0 mg ácido gálico/g muestra). Por un lado, hay una relación directa en la que a mayor cantidad de extracto mayor actividad antioxidante. Por otro, los liposomas etanólicos tuvieron mayor actividad probablemente debido a su mayor composición de compuestos altamente antioxidantes (como su mayor concentración de ácido clorogénico, potente agente antioxidante) y/o a su menor eficacia de encapsulación, que da lugar a mayor cantidad de extracto no encapsulado que puede interaccionar en mayor grado dando más actividad.

Conclusiones

Se obtuvieron dos extractos antioxidantes (acuoso y etanólico) a partir del hinojo marino mediante un proceso de extracción que incluye calentamiento y sonicación. El principal componente fenólico en ambos extractos fue el ácido clorogénico, siendo más abundante en el extracto etanólico. Ambos extractos se encapsularon eficientemente en liposomas de fosfatidilcolina de soja con una elevada estabilidad de partícula, encontrándose que la mayor parte del extracto estaba adherido a la membrana y no en el núcleo interno. El proceso de liofilización mejora la estabilidad de liposomas e incrementa el tamaño medio y la polidispersidad, siendo este aumento menos pronunciado en liposomas que incorporan compuestos fenólicos. Estos liposomas encapsulando el extracto de hinojo marino podrían emplearse para el diseño de alimentos funcionales. Futuros ensayos son necesarios para explorar la absorción intestinal de los extractos y liposoma y para confirmar que son capaces de ejercer algún efecto beneficioso en el organismo.

8.4. BIOACCESIBILIDAD Y ABSORCIÓN INTESTINAL *IN VITRO* DE UN EXTRACTO ACUOSO DE HINOJO MARINO (*CRITHMUM MARITIMUM*) ENCAPSULADO EN LIPOSOMAS DE FOSFATIDILCOLINA DE SOJA

Resumen

Se seleccionaron el extracto acuoso de hinojo marino (*Crithmum maritimum*) y el liposoma de fosfatidilcolina de soja incorporando dicho extracto al 64 % (con respecto a la cantidad de fosfatidilcolina), para estudiar su biodisponibilidad *in vitro*. El ácido clorogénico, compuesto fenólico mayoritario en el extracto, se encapsuló en el liposoma con una eficacia de encapsulación del 67 %. Tanto el extracto como el liposoma fueron sometidos a un proceso de digestión gastrointestinal simulada. La digestión del extracto dio lugar a una disminución en el contenido de ácido clorogénico del 40 %, mientras que, tras la digestión del liposoma, la cantidad del compuesto fenólico se incrementó con respecto al liposoma no digerido. La cantidad de ácido clorogénico libre bioaccesible, no obstante, fue similar para el extracto y la dispersión liposomal. En la dispersión liposomal, en cambio, podría haber ácido clorogénico que permanece encapsulado, pues los liposomas resistieron la digestión gastrointestinal.

Posteriormente se evaluó la absorción intestinal del ácido clorogénico del extracto y de la dispersión liposomal, a través de una monocapa de células Caco-2. El porcentaje de ácido clorogénico libre absorbido a través de la monocapa, después de 3 horas de incubación, fue significativamente igual para el extracto y el liposoma, tanto antes como después de la digestión gastrointestinal ($\approx 1,5$ %).

Palabras clave: biodisponibilidad, bioaccesibilidad, ácido clorogénico, hinojo marino, liposomas, absorción intestinal, digestión gastrointestinal, células Caco-2.

Introducción

La actividad biológica de los constituyentes de los alimentos está determinada, en gran medida, por su bioaccesibilidad y posterior biodisponibilidad. Previo a la absorción intestinal de cualquier compuesto, tiene lugar su liberación de la matriz alimentaria durante la digestión, generándose así la fracción bioaccesible. La biodisponibilidad, en cambio, es definida como la fracción que es absorbida y alcanza la circulación sistémica, para distribuirse y llegar al sitio específico donde puede ejercer su acción fisiológica (Porrini & Riso, 2008). La biotransformación que sufren los compuestos fenólicos durante el proceso digestivo, y su posterior absorción intestinal, van a determinar por tanto su efecto bioactivo en el organismo. La absorción de la mayoría de los compuestos fenólicos tiene lugar, principalmente, en el intestino delgado. La mayor parte de los polifenoles son estables a la acción de los ácidos estomacales (Gee et al., 1998), de forma que no se produce la hidrólisis de los mismos ni su absorción en esta fase del proceso digestivo, llegando al intestino en su forma nativa. Algunos compuestos fenólicos como el ácido cafeico, sí son absorbidos en el estómago gracias a su forma no ionizada, sus análogos esterificados, como es el caso del ácido clorogénico, sin embargo, suelen atravesar el estómago intactos (Olthof et al., 2001). Algunos autores han encontrado que el ácido clorogénico puede disminuir/transformarse durante la fase gástrica de la digestión (Siracusa et al., 2011; Quan et al., 2018), aunque la mayoría de los trabajos de investigación coinciden en que la degradación/transformación tiene lugar principalmente durante la fase intestinal (Bermúdez-Soto et al., 2007; Miren et al., 2015; Dawidowicz & Typek 2011; Baeza et al., 2017), provocada principalmente por el pH alcalino del medio.

Uno de los factores que determina la absorción de un compuesto es la permeabilidad a través de la mucosa intestinal. Diversos estudios confirman que la determinación *in vitro* de la permeabilidad, mediante modelos basados en membranas artificiales usando cultivos celulares,

puede ayudar a predecir la absorción *in vivo* de un compuesto. Las células del epitelio gastrointestinal humano no pueden utilizarse para la realización de estos ensayos porque no forman monocapas celulares. Como alternativa, se suelen utilizar células procedentes de un adenocarcinoma de colon (células Caco-2). Estas células, que se parecen morfológica y bioquímicamente a los colonocitos sanos, pueden formar una monocapa celular semejante al epitelio intestinal, condición imprescindible para poder desarrollar los estudios de absorción (Artursson, 1990).

Las células relacionadas con la absorción intestinal son células estructural y funcionalmente polarizadas. La polarización de estas células se garantiza por una red bien organizada de uniones intercelulares que separan el dominio apical del dominio basolateral (Alberts et al., 2003). La absorción a través del epitelio intestinal puede producirse de varias maneras. Según el sentido, se distinguen dos tipos de transporte activo: transporte de absorción, que va preferentemente desde el dominio apical o lumen hacia la sangre, y transporte de secreción o eflujo, que devuelve al lumen intestinal las moléculas absorbidas por el enterocito, limitando así su absorción. Diversos estudios han confirmado un transporte de absorción para el ácido clorogénico, aunque el porcentaje de este compuesto fenólico recuperado en el compartimento basolateral ha sido, en general, muy bajo, con valores inferiores al 3 % de la cantidad inicial del mismo en la matriz alimentaria (Miren et al., 2015; Konishy & Kobayashi, 2014; Farrel et al., 2012).

Existen diversas razones por las que encapsular un compuesto bioactivo, algunas tecnológicas, como se ha visto en capítulos anteriores, y otras por la posibilidad de proteger frente a la digestión gastrointestinal y favorecer la absorción intestinal. Diferentes estrategias se han llevado a cabo para intentar mejorar la absorción intestinal de los compuestos fenólicos, entre las que se encuentra la encapsulación de los mismos en liposomas. En este sentido, Feng et al. (2016), en un estudio *in vivo* con ratones, lograron incrementar 1,29 veces la biodisponibilidad del ácido clorogénico mediante la utilización de liposomas de lecitina de soja y colesterol.

La biodisponibilidad de los compuestos fenólicos en el intestino delgado, en general, es limitada (Manach et al., 2004) lo cual sugiere que gran parte de los mismos suele llegar al colon. La microbiota colónica está constituida por una población diversa de bacterias que degradan la matriz del alimento, transformando los componentes a metabolitos microbianos. Los fenoles son metabolizados mediante reacciones de hidrólisis, reducción, descarboxilación, desmetilación, deshdroxilación y rotura de anillos heterocíclicos para generar compuestos de menor peso molecular (Calani et al., 2012). Estos metabolitos microbianos, pueden ser entonces absorbidos localmente y llegar al hígado, donde podrían ser de nuevo transformados dando lugar a derivados microbianos glucuronidados y sulfatados antes de alcanzar la circulación sistémica y posteriormente los tejidos diana (Scalbert & Williamson, 2000). Además de estas reacciones metabólicas, tienen lugar cambios en cuanto al crecimiento y actividad de las bacterias debido a la influencia de los propios compuestos fenólicos y sus metabolitos (Requena et al., 2010). Jaquet et al. (2009), por ejemplo, encontraron que el consumo de tres tazas de café durante tres semanas producía un incremento de la actividad metabólica y en el contenido de *Bifidobacterium spp.*, lo cual evidencia que los compuestos fenólicos del café, entre los que destaca el ácido clorogénico, pueden tener un efecto prebiótico.

Objetivos

El tercer objetivo parcial de este capítulo fue estudiar la biodisponibilidad *in vitro* del extracto acuoso de hinojo marino (tanto sin encapsular como encapsulado en liposomas de fosfatidilcolina de soja); para lo cual se evaluó primeramente el efecto del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* en la composición fenólica del extracto y del liposoma relleno, y posteriormente la absorción del ácido clorogénico, como compuesto fenólico mayoritario en el

extracto, en un modelo de epitelio intestinal, utilizando soportes permeables bicamerales con monocapas de células Caco-2.

Materiales y métodos

Para el estudio de la absorción intestinal se seleccionó el extracto acuoso de hinojo marino (*Crithmum maritimum*), y el liposoma de fosfatidilcolina de soja incorporando dicho extracto al 64 % (L-HM-ac 64). La bioaccesibilidad del extracto y del liposoma se estudió mediante la simulación del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*. Tras ser sometidos a la digestión, la fracción soluble se analizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (RP-HPLC), utilizando una columna en fase reversa y siguiendo el método descrito para la identificación de compuestos fenólicos. Dado que únicamente se trabajó con el extracto acuoso de hinojo marino, en este diseño experimental HM corresponderá al extracto acuoso de hinojo y L-HM al liposoma encapsulando dicho extracto.

La posible citotoxicidad del extracto y el liposoma fue evaluada en células Caco-2, mediante el ensayo de viabilidad celular utilizando el Dojindo Cell Counting Kit-8.

El estudio de absorción intestinal *in vitro* del ácido clorogénico, presente en el extracto y el liposoma, antes y después de ser sometidos a digestión gastrointestinal simulada, se llevó a cabo mediante un modelo celular de epitelio intestinal humano con células Caco-2. El seguimiento de la formación de la monocapa celular se realizó a través de la medida de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER).

Resultados y discusión

Efecto del proceso de digestión gastrointestinal

Para determinar la bioaccesibilidad del extracto acuoso de hinojo marino (sin encapsular y encapsulado en nanoliposomas), ambos fueron sometidos a un proceso de digestión gastrointestinal simulada (DGI). Al final de la fase gástrica (2 horas con pepsina a pH 2, 37 °C, abreviada como DG), el perfil cromatográfico apenas se vio modificado, disminuyendo ligeramente (menos de un 5 %) la cantidad de ácido clorogénico en el extracto, y sin ninguna modificación apreciable en el liposoma (Figura 59). Algunos estudios han atribuido la estabilidad del ácido clorogénico durante la digestión gástrica al pH ácido del medio, que proporciona un entorno más adecuado para la estabilidad química de este compuesto (Bermúdez-Soto et al., 2007).

Al final de la fase intestinal (2 horas con sales biliares y pancreatina a pH 7,2, 37 °C, abreviada como DGI), en cambio, el ácido clorogénico fue mucho más sensible a la degradación/transformación, y la cantidad presente en el extracto disminuyó en un 40 % (Figura 59; Tabla 19). Los cromatogramas también mostraron el incremento y/o la aparición de algunos compuestos no identificados, que podrían ser el resultado de la transformación del ácido clorogénico u otros de los compuestos fenólicos presentes en el extracto, como consecuencia de la acción de las enzimas, la temperatura y/o el pH del medio. Los nuevos compuestos formados podrían corresponder a los isómeros ácidos neoclorogénico o criptoclorogénico (Bermudez-Soto et al., 2007; Dawidowicz & Typek 2011). El ácido clorogénico, en cambio, no parece haber sido hidrolizado, pues entre los compuestos formados no identificamos el ácido cafeico. Estudios previos sugieren que las enzimas presentes en el intestino delgado no suelen influir en la transformación del ácido clorogénico, y que, sin embargo, son la temperatura, y especialmente el pH alcalino del medio, los principales responsables de la disminución/transformación de éste ácido (Baeza et al., 2017). Estos autores encontraron una disminución en el contenido de este compuesto fenólico del 43-45 % tras la digestión gastrointestinal de bebidas preparadas a partir de yerba mate y café. Sengul et al.

(2014) también encontraron que el ácido clorogénico, presente en un extracto de granada, fue estable durante la fase gástrica, pero sufrió una fuerte degradación al final del proceso de digestión gastrointestinal, cuantificándose en este caso una pérdida del 77 % del mismo. Siracusa et al. (2011), en cambio, encontraron que el ácido clorogénico fue inestable tanto en la fase gástrica como en la intestinal, estudiando el efecto de la digestión gastrointestinal en una infusión de hinojo marino, con una pérdida final del 82 % del compuesto fenólico. Otros autores, por el contrario, han observado una alta estabilidad a lo largo de todo el proceso de digestión *in vitro* del ácido clorogénico presente en matrices alimentarias, como flores comestibles y semillas de frutas (Chen et al., 2015; Mosele et al., 2015; He et al., 2016).

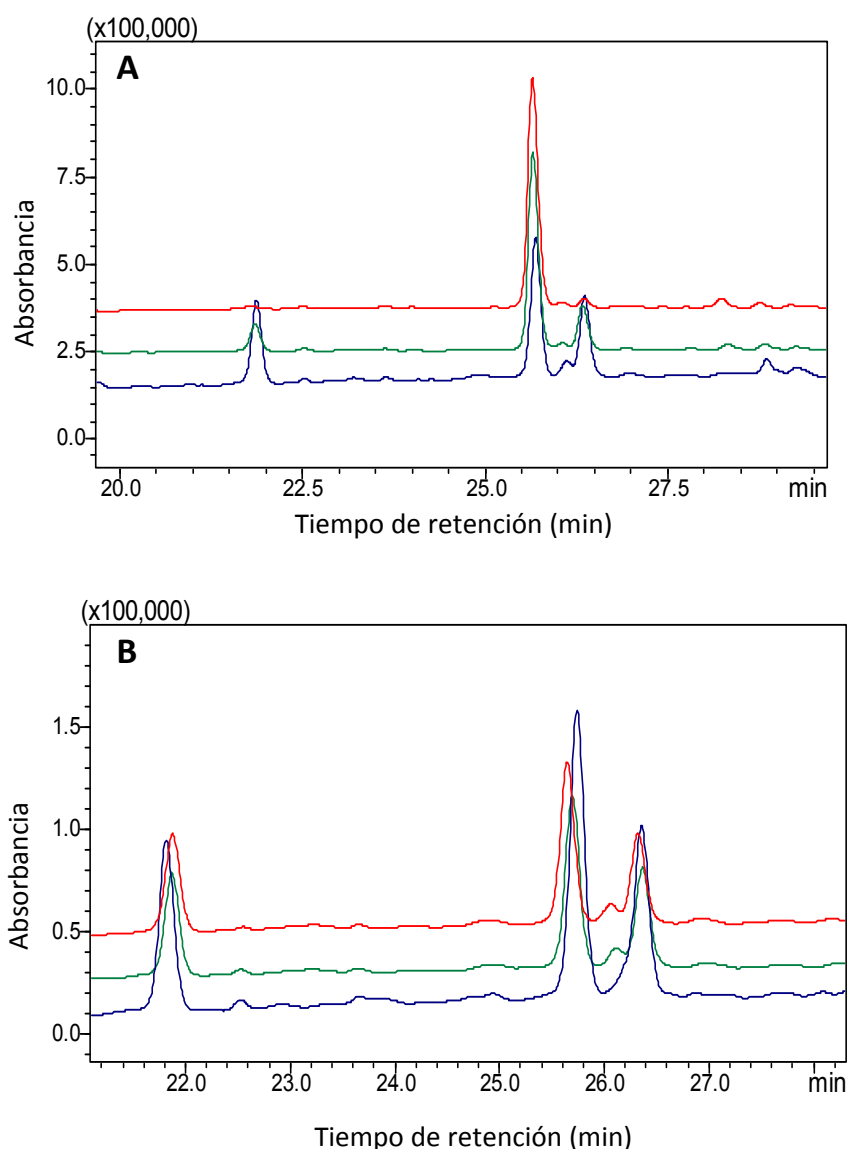


Figura 59. Perfil cromatográfico a λ 253 nm del extracto de hinojo (HM) y el liposoma encapsulando dicho extracto (L-HM), antes y después de la DGI. A) Línea roja: HM. Línea verde: DG-HM. Línea azul: DGI-HM. B) Línea roja: L-HM. Línea verde: DG-L-HM. Línea azul: DGI-L-HM.

Como ya se había descrito previamente, la cantidad de ácido clorogénico que se cuantifica en el liposoma es un 33 % inferior con respecto al extracto sin encapsular, debido a que sólo se cuantifica el compuesto fenólico que está libre (no encapsulado) en la dispersión. Al final del proceso de digestión del liposoma, contrario a lo que ocurre con el extracto, la cantidad de

clorogénico es mayor que en la dispersión liposomal sin digerir. Así, parte del ácido clorogénico que permanecía protegido en los liposomas se ha liberado, mejorando la bioaccesibilidad del clorogénico en la dispersión liposomal. El incremento del compuesto fenólico en el liposoma digerido alcanza valores similares a los obtenidos para el extracto digerido (Tabla 19), por lo que la cantidad de ácido clorogénico libre bioaccesible, en principio, es similar para el extracto y el liposoma; sin embargo, podría permanecer cierta cantidad de clorogénico atrapada dentro de los liposomas, pues los mismos resisten el proceso de DGI, ya que pudimos comprobar la presencia de liposomas tras el proceso de digestión. Por otro lado, como se ha mencionado anteriormente, durante la digestión gastrointestinal el ácido clorogénico liberado del liposoma también ha podido sufrir procesos de transformación.

Tabla 19. Concentración del ácido clorogénico ($\mu\text{g/mL}$) presente en el extracto de hinojo y en la dispersión liposomal correspondiente (antes y después de la digestión gastrointestinal). Diferentes letras (a, b, c) indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre muestras.

| | Ácido clorogénico ($\mu\text{g/mL}$) |
|---------------------------------|--|
| Extracto de Hinojo (HM) | $40,3 \pm 0,3^c$ |
| Liposoma (L-HM) | $13,4 \pm 0,8^a$ |
| Digerido HM (DGI-HM) | $24,2 \pm 0,3^b$ |
| Digerido L-HM (DGI-L-HM) | $24,6 \pm 0,5^b$ |

Citotoxicidad

Previo al estudio de absorción intestinal, se evaluó el posible efecto citotóxico del extracto acuoso de hinojo marino y del liposoma encapsulando dicho extracto, en células Caco-2. El extracto no presentó citotoxicidad a ninguna de las concentraciones estudiadas, tal y como se refirió con anterioridad. El liposoma, en cambio, sí provocó una ligera disminución en la viabilidad celular (Figura 60). En cualquier caso, la viabilidad celular fue superior al 75 % en todas las concentraciones testadas.

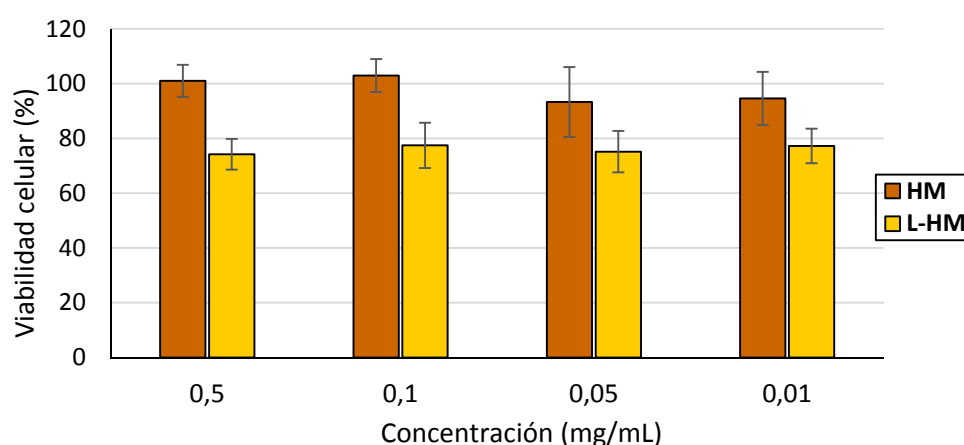


Figura 60. Viabilidad celular frente a células Caco-2 (% con respecto a células controles sin tratar) incubadas durante 24 horas a diferentes concentraciones de extracto de hinojo (HM) y liposoma encapsulando el extracto (L-HM).

* El extracto es la misma información que la figura 51, introducida en esta figura con propósitos comparativos.

Absorción intestinal

Para evaluar la biodisponibilidad del ácido clorogénico presente en el extracto de hinojo marino, se analizaron tanto el extracto como la dispersión liposomal, antes y después de ser sometidos al proceso de digestión gastrointestinal simulada. Para ello, se utilizó un modelo bien establecido de absorción consistente en soportes permeables bicamerales (Transwell), donde se sembraron e incubaron las células Caco-2 hasta la formación de una monocapa diferenciada, emulando el paso del extracto por el intestino delgado.

Como puede observarse en la tabla 20, la cantidad de ácido clorogénico que atravesó la monocapa de células Caco-2 aumentó con el tiempo. No obstante, la permeabilidad *in vitro* del compuesto fenólico, en general, fue limitada, siendo el contenido en el compartimento basolateral apenas un 1,4-1,6 % de la cantidad inicial al cabo de las 3 horas de incubación, sin encontrarse diferencias significativas si el extracto estaba encapsulado o no. La cantidad de ácido clorogénico que atraviesa la membrana fue, por tanto, muy inferior a la cantidad libre presente tanto en el extracto como en la dispersión liposomal (fracción no encapsulada). En estudios similares con extractos de café, otros autores también han encontrado una baja absorción del ácido clorogénico. Así, Konishi & Kobayashi (2004) y Dupas et al. (2006) cuantificaron en el compartimento basolateral valores inferiores al 1 y 1,5 % del ácido clorogénico inicialmente analizado, mientras que Miren et al. (2015) llegaron a recuperar un 2,8 % del ácido clorogénico en el compartimento basolateral. A pesar de que diversos estudios han demostrado que los liposomas pueden atravesar la membrana intestinal y ser absorbidos con cierta facilidad (Sangsuriyawong et al., 2019), en el presente trabajo no detectamos la presencia de liposomas en el compartimento basolateral. En un estudio *in vivo* en ratones, pudo observarse que la encapsulación del ácido clorogénico en liposomas de fosfatidilcolina de soja con colesterol, incrementó 1,29 veces la biodisponibilidad del compuesto fenólico y mejoró el efecto antioxidante del mismo (Feng et al., 2016).

Tabla 20. Porcentaje de ácido clorogénico que atraviesa la membrana con la monocapa de células Caco-2 después de 1 h y 3 h de incubación. Diferentes letras (a) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre muestras.

| | Ácido clorogénico (% - 1 h) | Ácido clorogénico (% - 3 h) |
|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Extracto de Hinojo (HM) | 0,83 ± 0,09 ^a | 1,53 ± 0,30 ^a |
| Liposoma (L-HM) | 0,86 ± 0,12 ^a | 1,58 ± 0,43 ^a |
| Digerido HM (DGI-HM) | 0,91 ± 0,15 ^a | 1,42 ± 0,61 ^a |
| Digerido L-HM (DGI-L-HM) | 0,90 ± 0,08 ^a | 1,49 ± 0,52 ^a |

Diferentes estudios describieron un mecanismo preferente de absorción para el ácido clorogénico, indicando que el transporte se daría preferentemente en sentido apical-basolateral (Miren et al., 2015; Konishy & Kobayashi, 2014; Farrel et al., 2012). Una gran dificultad de este tipo de estudios *in vitro* es la inestabilidad de los compuestos fenólicos en las condiciones de incubación. Analizando el contenido del ácido clorogénico tanto en el compartimento basolateral como en el apical, encontramos que, al cabo de las 3 h de incubación, sólo se recupera un 66-68 % del compuesto original. Miren et al. (2015) recuperaron un porcentaje similar al de este trabajo (70 %) para el ácido clorogénico, mientras que Scherbl et al. (2014) observaron una degradación aún mayor con una pérdida de hasta el 60 % después de 4 horas

de incubación. Hay que tener en cuenta que se ha determinado el ácido clorogénico por ser el compuesto mayoritario del extracto de hinojo, pero no se ha considerado la determinación de otros compuestos del extracto, o bien metabolitos producidos y que hayan podido ser absorbidos.

Estudios en humanos encontraron que, tras la ingesta de 200 mL de café (146 mg de derivados hidroxicinámicos, siendo un 29 % ácidos clorogénicos), la concentración máxima para el ácido clorogénico sin metabolizar fue de 2,2 nM, mientras que otros metabolitos derivados (ácido cafeico-3-O-sulfato y las lactonas sulfatadas de los ácidos 3-cafeoilquinico y 4-cafeoilquinico) alcanzaron valores de concentración máxima de 20-92 nM (Stalmach et al., 2009).

Los resultados del presente trabajo igualmente sugieren que la mayor parte del ácido clorogénico presente en el extracto de hinojo no fue absorbido en el intestino delgado, pudiendo alcanzar el colon donde sería susceptible de la acción de la microbiota colónica, teniendo lugar la formación de metabolitos microbianos que podrían ser entonces absorbidos, y/o presentando un posible efecto prebiótico, como el descrito por Jaquet et al. (2009) para un extracto de café rico en ácido clorogénico.

Según Recher et al. (2004), el ácido clorogénico, mediante dos rutas diferentes de transformaciones de metabolitos intermedios que pueden ser absorbidos por el intestino grueso o por colon, podría dar lugar a 3-hidroxihipúrico o ácido hipúrico, respectivamente, en la última transformación en el hígado. Estudios futuros son necesarios para evaluar si los liposomas, y el ácido clorogénico encapsulado en los mismos, podrían llegar al colon y ser igualmente transformados por la microbiota colónica.

Conclusiones

El extracto de hinojo marino es susceptible a la degradación/transformación durante el proceso de digestión gastrointestinal, teniendo lugar una disminución en el contenido de ácido clorogénico del 40 %. Los liposomas resisten la DGI, y una parte del ácido clorogénico encapsulado en los mismos es liberado durante la fase intestinal de la digestión. Sin embargo, al final de la digestión gastrointestinal la cantidad de clorogénico libre bioaccesible es similar en el extracto y en la dispersión liposomal. La absorción intestinal del ácido clorogénico, estudiada a través de una monocapa de células Caco-2, es limitada. La mayor parte del ácido clorogénico libre, así como el que permanece encapsulado en liposomas, debería alcanzar el colon. Estudios futuros son necesarios para conocer la transformación y el efecto de los liposomas en la microbiota colónica.

CAPÍTULO 3. APLICACIÓN DE LIPOSOMAS EN PRODUCTOS REESTRUCTURADOS

8.5. AGREGACIÓN PROTEICA, AGUA LIGADA Y GELIFICACIÓN TÉRMICA DE MÚSCULO DE MERLUZA HOMOGENEIZADO CON SAL EN PRESENCIA DE LIPOSOMAS DE FOSFATIDILCOLINA DE SOJA CON GLICEROL SOMETIDOS A DIFERENTES TRATAMIENTOS DE ESTABILIZACIÓN

Resumen

Diferentes liposomas de fosfatidilcolina de soja estabilizados mediante diversos tratamientos, tales como alta presión, congelación-descongelación, liofilización y atomización, se incorporaron en músculo de merluza (*Merluccius merluccius*) previamente homogeneizado con sal, para estudiar el efecto de la adición de dichos liposomas sobre la agregación proteica, la retención de agua y la gelificación térmica del músculo. Los liposomas tuvieron un tamaño medio de partícula de 123-507 nm y un potencial zeta entre -40,0 mV y -49,5 mV. La adición de liposomas disminuyó la solubilidad proteica e incrementó la capacidad de retención de agua del músculo de merluza homogeneizado con sal, independientemente del tamaño de partícula o la carga superficial de membrana de los liposomas. Además, los liposomas indujeron un aumento de la estabilidad térmica de la proteína, observado por Calorimetría Diferencial de Barrido, y un aumento del espacio entre las miofibrillas del músculo, dando lugar a más agua atrapada dentro de la red proteica miofibrilar, como se observó por Resonancia Magnética Nuclear de Protón de Bajo Campo. La presencia de liposomas modificó el comportamiento viscoelástico e interfirió con la agregación térmica de las proteínas musculares, siendo los mecanismos de esta interferencia diferentes en función del tipo de preparación liposomal (en dispersión o en estado seco). Los resultados obtenidos sugieren el posible uso de una especie de pescado altamente apreciada para el desarrollo de productos de pescado funcionales, de alto valor añadido gracias a la adición de liposomas.

Palabras clave: homogeneizado/reestructurado de merluza, agregación proteica, agua ligada, gelificación térmica, liposomas secos, fosfatidilcolina de soja.

Introducción

La merluza (*Merluccius merluccius*) es una de las especies demersales de pescado de aguas Europeas más apreciadas y se encuentra ampliamente distribuida en sus costas, tanto en el Mediterráneo como en el Mar del Norte y al este del Océano Atlántico.

Desde el 01 de Enero de 2015, el Reglamento UE 1380/2013, aprobado por el Parlamento Europeo como parte de una Política Pesquera Común para la conservación y explotación sostenible de los recursos pesqueros, ha comenzado a implementar la obligación de desembarque para las pesquerías comerciales con Captura Total Permitida (TAC) o con un Tamaño Mínimo de Desembarque (MLS) en aguas europeas y para barcos europeos que pescan en alta mar. El pescado descartado no puede utilizarse para el consumo humano directo; sin embargo, una transformación apropiada en productos pesqueros gelificados representaría un uso económicamente rentable de estos recursos.

La merluza europea es una especie con un elevado valor económico, que normalmente se consume en fresco o en filetes y piezas congeladas. Cuando se excede la cuota de captura, la excelente capacidad para formar gel de las proteínas musculares de esta especie le podrían permitir ser usada para obtener productos saludables alternativos con un alto valor añadido (Martelo-Vidal et al., 2016; Moreno et al., 2010). La merluza posee un color claro, bajo contenido en grasa y sabor suave, características muy adecuadas para el desarrollo productos funcionales basados en geles con la incorporación de nutrientes específicos o compuestos bioactivos. Algunos autores han empleado homogeneizados de merluza, de otras especies de menor valor comercial, para la obtención de productos reestructurados de pescado, como Zhou & Li-Chan (2009) con *M. productus* y Cardoso et al. (2008) con *M. capensis*.

La encapsulación de compuestos bioactivos en liposomas mejora su eficacia y su resistencia a la degradación en sistemas alimentarios (Da Silva Malheiros et al., 2010; Mozafari et al., 2008). Las suspensiones liposomales son estables durante un tiempo limitado, a partir del cual, eventos como la agregación, oxidación o desprendimiento del bioactivo pueden tener lugar. Para mejorar la estabilidad existen diferentes métodos tecnológicos, tales como la congelación (Chen et al., 2010), la liofilización (Sebaaly et al., 2016) o la atomización (Gültekin-Özgüven et al., 2016). Además, la adición de crioprotectores protege a las bicapas frente al daño por congelación y liofilización (Stark et al., 2010). La alta presión hidrostática (APH) es una pasteurización en frío implementada en la industria alimentaria, por lo que también se considera un proceso alternativo para la preservación y descontaminación de sistemas alimentarios (Rigaldie et al., 2003).

Actualmente no existe información disponible acerca de la influencia de las propiedades hidrodinámicas de partícula y del estado físico de liposomas en la agregación térmica de las proteínas musculares de pescado, lo que podría ser de interés para el desarrollo de productos de pescado gelificados funcionales con propiedades tecnológicas y sensoriales adecuadas.

Objetivos

El primer objetivo parcial de este capítulo fue evaluar el impacto de diferentes tratamientos de estabilización (alta presión, congelación-descongelación, liofilización y atomización) en las propiedades de liposomas de fosfatidilcolina de soja y estudiar el efecto de la adición de diferentes tipos de liposomas en la agregación proteica, capacidad de retención de agua y propiedades gelificantes de músculo de merluza, previamente homogeneizado con sal, utilizado como sistema modelo para el desarrollo de productos de pescado funcionales con base de gel.

Materiales y métodos

Inicialmente se extrajo fosfatidilcolina parcialmente purificada tras cinco lavados con acetona (FC5) de la lecitina de soja (LS).

Seguidamente, se prepararon dos formulaciones liposomales diferentes, una con glicerol y otra sin glicerol, en la que la cantidad correspondiente al glicerol se sustituye por buffer fosfato. Posteriormente, ambas dispersiones se sometieron a diferentes tratamientos de estabilización: alta presión hidrostática, congelación-descongelación, liofilización y atomización.

El tratamiento de alta presión (AP) se aplicó en un equipo de alta presión bajo condiciones de 600 MPa, 20 °C y 20 min (1 ciclo). Los liposomas denominados congelados-descongelados (CD) fueron congelados a -20 °C durante 24 h y después se descongelaron a temperatura ambiente. Los liposomas sometidos a liofilización (LF) se congelaron a -80 °C y después se liofilizaron, mientras que los liposomas sometidos a atomización (A) se atomizaron directamente a condiciones de temperatura interna de 170 °C, temperatura externa de 89 °C, aspiración de 70 %, bomba 20 % y con flujo de aire de 45 mm. Una suspensión control basada en liposomas sin tratamiento tecnológico se estudió en paralelo (F, fresco). De esta manera se obtuvieron diferentes liposomas en función del tratamiento y de la formulación de partida: fresco (F), alta presión (AP), congelado-descongelado (CD), congelado-descongelado con glicerol (CD-G), liofilizado (LF), liofilizado con glicerol (LF-G) y atomizado (A).

Todas las dispersiones liposomales en estado fresco se concentraron por centrifugación a 4000 g y 2 °C durante 1 h empleando filtros de centrífuga, obteniéndose porcentajes de concentración del 25,0 % para F; 24,6 % para AP; 6,4 % para CD; y 19,2 % para CD-G; y se conservaron a 4 °C hasta su utilización. En cambio, los liposomas secados mediante los tratamientos de liofilización y atomización (LF, LF-G y A) se mantuvieron a -20 °C.

De todos estos liposomas se estudiaron sus propiedades hidrodinámicas mediante dispersión dinámica de luz en Zetasizer. Las preparaciones desecadas (liofilizados y atomizados) se rehidrataron previamente a una concentración de 77 mg/mL. A todas las dispersiones se les aplicó una dilución posterior 1/10 para realizar la medida. También se determinó el contenido en agua y la dispersabilidad en agua.

A continuación, los liposomas estabilizados con diversos tratamientos se incorporaron en músculo de merluza fresco. Las dispersiones liposomales (F, AP, CD y CD-G) se añadieron (1:2, v/p) al músculo de merluza, previamente homogeneizado con sal (NaCl 1 %), y se homogeneizó la mezcla durante 2 min. Por su parte, los liposomas secos (LF, LF-G y A) se incorporaron al músculo, también previamente homogeneizado con sal (NaCl 1 %), en igual proporción (1:2), pero de diferente manera. Inicialmente, 4,69 g de LF; 6,48 g de LF-G; y 6,47 g de A se añadieron al músculo y se homogeneizaron durante 1 min. Seguidamente, la mezcla se completó con agua desionizada hasta conseguir la proporción 1:2, y se homogeneizó nuevamente durante 3 min más. De esta forma, ambas formulaciones (dispersiones y liposomas secos) estuvieron en la misma proporción con respecto al músculo (1:2) y tuvieron la misma cantidad de peso seco. Un homogeneizado control sin liposomas añadidos (MC) se estudió en paralelo. Los homogeneizados o masas se conservaron a 4 °C hasta su uso.

De los homogeneizados de merluza con liposomas se caracterizó su contenido en agua, solubilidad proteica, cantidad de agua ligada mediante la técnica de capacidad de retención de agua y por Resonancia Magnética Nuclear de Protón de Bajo Campo, propiedades físicas mediante Calorimetría Diferencial de Barrido y reología dinámica oscilatoria. Los agregados de su fracción de proteína soluble (obtenida de la técnica de solubilidad proteica) se caracterizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y dispersión dinámica de luz en Zetasizer (dilución 1/100).

Finalmente, los homogeneizados se sometieron a un proceso de gelificación y se estudiaron sus propiedades mecánicas mediante texturometría.

Resultados y discusión

Caracterización de liposomas estabilizados con diversos tratamientos

Características de partícula

Se analizaron las propiedades de partícula de liposomas sometidos a diversos tratamientos (Tabla 21).

Tabla 21. Tamaño (nm), índice de polidispersidad y potencial zeta (mV) de liposomas estabilizados con diversos procesados, donde F: fresco; AP: alta presión; CD: congelado/descongelado; CD-G: congelado/descongelado con glicerol; LF: liofilizado; LF-G: liofilizado con glicerol; A: atomizado. Diferentes letras (a, b, c, d, e, f) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre liposomas.

| | Tamaño (nm) | Índice de polidispersidad | Potencial Zeta (mV) |
|------|---------------------------|------------------------------|--------------------------|
| F | 141,3 ± 1,9 ^b | 0,225 ± 0,003 ^a | -44,8 ± 1,8 ^b |
| AP | 141,4 ± 1,2 ^b | 0,228 ± 0,008 ^a | -45,0 ± 1,7 ^b |
| CD | 507,1 ± 12,6 ^e | 0,545 ± 0,014 ^c | -39,6 ± 1,2 ^c |
| CD-G | 123,3 ± 1,0 ^a | 0,220 ± 0,011 ^a | -42,9 ± 1,8 ^b |
| LF | 181,0 ± 5,2 ^c | 0,332 ± 0,033 ^b | -44,3 ± 1,7 ^b |
| LF-G | 274,6 ± 5,8 ^d | 0,383 ± 0,055 ^b | -49,5 ± 1,0 ^a |
| A | 177,9 ± 2,8 ^c | 0,393 ± 0,025 ^b | -44,6 ± 0,6 ^b |

El tratamiento de alta presión (AP) no modificó ninguna característica de partícula ($p>0,05$) de los liposomas, pues tanto los liposomas de alta presión como los liposomas frescos (control sin tratamiento, F) mostraron los mismos valores de tamaño medio (141 nm) y potencial zeta (-45 mV). Además, mostraron valores muy parecidos de índice de polidispersidad ($\approx 0,23$), los cuales se reflejaron gráficamente en la figura 61, donde ambos mostraron una distribución monomodal muy similar.

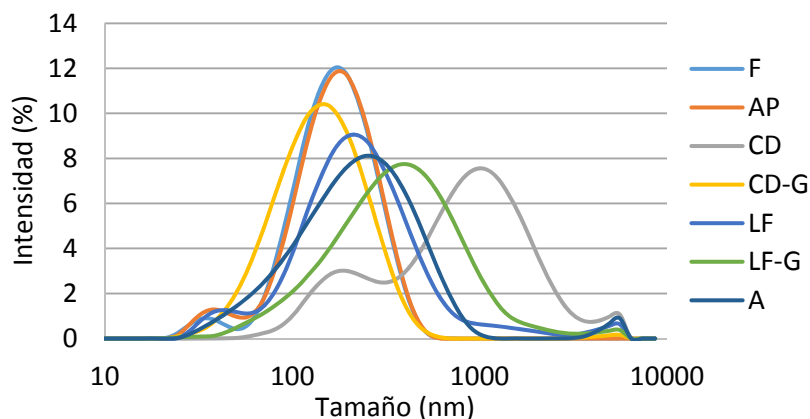


Figura 61. Distribución de tamaños de partícula de liposomas estabilizados con diversos procesos, donde F: fresco; AP: alta presión; CD: congelado/descongelado; CD-G: congelado/descongelado con glicerol; LF: liofilizado; LF-G: liofilizado con glicerol; A: atomizado.

Estos resultados indican que las dispersiones liposomales podrían ser estabilizadas con tratamientos de altas presiones a 600 MPa sin sufrir efectos de agregación o fusión. Las altas presiones se emplean habitualmente para la inhibición del crecimiento de microorganismos presentes en los alimentos, por lo que los liposomas podrían ser estabilizados mediante este método desde un punto de vista microbiológico. Sin embargo, Perrier-Cornet & Gervais (2005) observaron cambios morfológicos consistentes en interdigitación y cambios en la fluidez de la membrana lipídica cuando sometieron los liposomas a un tratamiento moderado de alta presión, por lo que pequeños cambios en los liposomas no podrían ser descartados. Aun así, las imágenes de microscopía de estos liposomas (Figura 62) no mostraron cambios evidentes en la morfología de los liposomas sometidos a altas presiones (AP), presentando visualmente un tamaño medio y heterogeneidad de tamaños similar a la de los liposomas frescos (F), así como la presencia de algunas invaginaciones similares en ambas muestras.

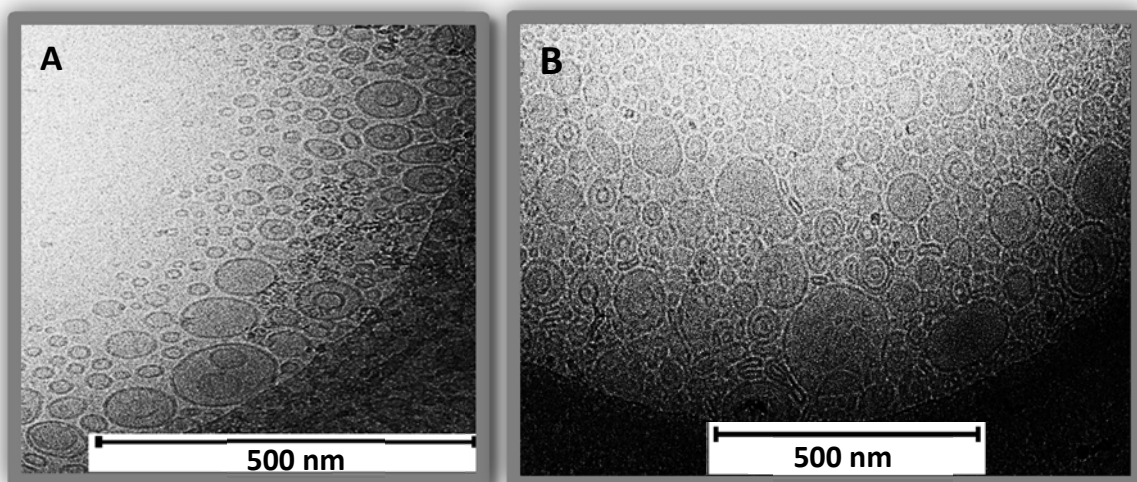


Figura 62. Microscopía electrónica de transmisión mediante criofijación de los liposomas estabilizados. A) Dispersión liposomal fresca (F). B) Dispersión liposomal sometida a tratamiento de altas presiones a 600 MPa (AP).

El tratamiento de congelación/descongelación (CD) indujo un notable incremento ($p \leq 0,05$) del tamaño medio (507,1 nm) y del índice de polidispersidad (0,545), y una pequeña reducción ($p \leq 0,05$) de la carga electronegativa de la membrana (-39,6 mV) con respecto a los liposomas frescos. Además, mostraron una distribución de tamaños bimodal, con un mayor número de vesículas de tamaño $\approx 1 \mu\text{m}$ y una menor proporción de vesículas del tamaño original de 140 nm. Estas diferencias con el control indican que el proceso de congelación está produciendo una serie de cambios morfológicos en los liposomas. Estos cambios implican un mayor grado de agregación vesicular y una menor estabilidad liposomal.

Los liposomas sometidos al mismo tratamiento de congelación/descongelación pero incorporando el crioprotector glicerol (CD-G) mostraron mejores propiedades de partícula (menor tamaño e índice de polidispersidad y potencial más electronegativo, así como una distribución monomodal con una única población de pequeño tamaño) que los liposomas sin glicerol (CD) ($p \leq 0,05$). Esto demuestra que el glicerol está ejerciendo un efecto protector sobre los liposomas frente a los daños ocasionados por el proceso de congelación/descongelación. El glicerol es un reconocido crioprotector de liposomas que mejora la estabilidad de las vesículas y evita la agregación o sedimentación de partículas frente a los procesos de congelación y descongelación de la muestra (Mozafari, 2005).

El tratamiento de liofilización (LF) indujo un aumento ($p \leq 0,05$) del tamaño medio (181,0 nm) y del índice de polidispersidad (0,332) con respecto al control, sin cambios significativos en el potencial zeta (-44,3 mV), lo que significa que no altera la estabilidad de los liposomas pero sí modifica el tamaño de las vesículas. Este efecto se atribuye a que el proceso de eliminación del agua produjo la rotura de puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua y las cabezas polares de los fosfolípidos de membrana, desencadenando un efecto de agregación (Stark et al., 2010), el cual provoca el incremento del tamaño medio vesicular.

Los liposomas liofilizados con glicerol (LF-G) experimentaron un incremento ($p \leq 0,05$) del tamaño medio con respecto a sus correspondientes liposomas sin glicerol (LF), sin cambios significativos en el índice de polidispersidad (todos mostraron una distribución claramente monomodal con una única población definida de pequeño tamaño) y potencial zeta, aunque este último parámetro tornó hacia valores más electronegativos. La adición de glicerol ya se ha descrito que incrementa el tamaño de las vesículas (Manca et al., 2013). Sin embargo, Ohtake et al. (2006) no observaron incremento en el tamaño medio en liposomas de dipalmitoilfosfatidilcolina congelados y liofilizados. El glicerol, de acuerdo con Mozafari (2005), también protege a los liposomas frente a los daños ocasionados por el proceso de liofilización. El incremento observado podría atribuirse a su distribución desigual a lo largo de la membrana (Christensen et al., 2007).

El tratamiento de atomización (A) presentó las mismas diferencias con respecto a los liposomas frescos que los liposomas liofilizados (LF), es decir, mantuvo la estabilidad de membrana pero incrementó el tamaño medio y el índice de polidispersidad, ya que estos dos liposomas tratados mostraron valores muy similares ($p > 0,05$) para los tres parámetros de partícula. Este mismo efecto lo observaron Frenzel et al. (2015) comparando entre liposomas frescos y liposomas atomizados. Estos resultados sugieren que los pequeños cambios de tamaño de partícula observados tanto en liofilizados (LF) como en atomizados (A) con respecto a los frescos (F) son debidos al proceso de desecación de los liposomas. Sin embargo, los grandes cambios en el tamaño medio están relacionados con el proceso de congelación. El glicerol puede alterar estas características de partícula.

Los liposomas atomizados presentaron un tamaño de 177,9 nm, valor muy inferior a los obtenidos por otros autores como Frenzel et al. (2015) o Wang et al. (2015) (400-430 nm), lo que se atribuye a las diferentes condiciones en el proceso de secado así como al tamaño inicial de los liposomas antes de ser tratados. Telang & Thorat (2010) demostraron que las variaciones

en las condiciones de atomización (temperatura, presión, tasas de aspiración, de flujo de aire y de flujo de alimentación) tienen una fuerte influencia en el tamaño final de los liposomas, así como en otras propiedades físicas.

Contenido en agua

El contenido en agua de las dispersiones liposomales tratadas (Tabla 22) fue muy elevado, con valores comprendidos entre 91,6-94,0 %, dado que son muestras en estado líquido.

Tabla 22. Contenido en agua (%) y dispersabilidad en agua (%) de liposomas estabilizados con diversos procesados, donde F: fresco; AP: alta presión; CD: congelado/descongelado; CD-G: congelado/descongelado con glicerol; LF: liofilizado; LF-G: liofilizado con glicerol; A: atomizado. Diferentes letras (a, b, c, d, e, f) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre liposomas.

| | Contenido en agua (%) | Dispersabilidad en agua (%) |
|------|-------------------------------|-------------------------------|
| F | 93,03 \pm 0,01 ^d | 100,0 \pm 0,79 ^b |
| AP | 93,44 \pm 0,38 ^d | 100,0 \pm 3,69 ^b |
| CD | 94,04 \pm 0,06 ^d | 100,0 \pm 9,14 ^b |
| CD-G | 92,64 \pm 0,20 ^d | 93,40 \pm 0,53 ^b |
| LF | 4,78 \pm 0,72 ^a | 100,0 \pm 1,55 ^b |
| LF-G | 14,87 \pm 2,12 ^b | 71,29 \pm 1,81 ^a |
| A | 19,20 \pm 0,84 ^c | 99,01 \pm 0,54 ^b |

En cuanto a los liposomas desecados, su contenido en agua fue menor que en las dispersiones ya que son sometidos a procesos que eliminan parte del agua contenida en la muestra, siendo sus valores del 14,9 % para LF-G y del 19,2 % para A (presentaron una consistencia grasa, atribuida a la presencia de glicerol y al método de secado, respectivamente) y del 4,8 % para LF (con una consistencia de polvo fino debida a la ausencia de glicerol). La considerable proporción de agua residual retenida en las muestras LF-G y A pudo deberse a que los procesos de secado no se realizaron de acuerdo a los requerimientos específicos de estas formulaciones. En concreto, el elevado valor de contenido en agua para los liposomas atomizados (A) podría ser atribuido a la alta tasa de aspiración empleada en el proceso de atomización (70 %), que podría dificultar la correcta extracción de agua de la muestra (Telang & Thorat, 2010). Cada preparación liposomal ofrece una serie de posibilidades diferentes en función de su textura y consistencia, siendo todas ellas muy estables y con buenas propiedades de partícula.

Dispersabilidad en agua

La dispersabilidad en agua de los liposomas en formato de dispersión fue excelente, con valores del 100 % para los liposomas F, AP y CD, y ligeramente inferior para los liposomas que tienen incorporado crioprotectores, CD-G (93,4 %). Estos menores valores se debieron a la presencia de glicerol en las formulaciones liposomales. Las diferencias observadas en el contenido de agua residual no fueron determinantes en la capacidad de dispersabilidad en agua de los liposomas en formato deshidratado (Tabla 22), pues todos ellos presentaron muy elevadas tasas de dispersabilidad: 100 % para LF y 99,0 % para A, a excepción de LF-G que mostró un valor de 71,3 %, confirmando que el glicerol dificulta la dispersabilidad en agua. El glicerol evita la agregación de los liposomas y ejerce otros efectos beneficiosos sobre ellos, pero puede que no sea el crioprotector más adecuado si los liposomas van a ser liofilizados. En este caso, otros crioprotectores, como la trealosa, podrían ser más indicados (Stark et al., 2010).

Caracterización de homogeneizados de merluza formulados con liposomas

Contenido en agua

El contenido en agua de los homogeneizados de merluza (Tabla 23) (82,3-86,9 %) fue ligeramente superior al del músculo entero sin tratar (80,5 %), probablemente debido al agua extra añadida en las formulaciones, procedente bien directamente de las dispersiones liposomales, o bien del agua añadida en los homogeneizados con liposomas secos y en la masa sin liposomas con el fin de ajustar el contenido de humedad final. Entre los homogeneizados, aquellos con liposomas incorporados tuvieron valores muy similares (84,0-85,6 %), ligeramente inferiores al del homogeneizado sin liposomas (MC), que fue del 86,9 %. Esta diferencia se debe a la fracción de materia seca presente tanto en las dispersiones liposomales como en los liposomas secos que no fue adicionada en el homogeneizado control. No hubo diferencias apreciables en el contenido en humedad entre homogeneizados en función del tipo de preparación liposomal incorporada.

Solubilidad proteica

La solubilidad proteica de las masas (Tabla 23) fue mayor ($p \leq 0,05$) para el control (MC, 78,95 %) que para las que incorporan liposomas (55,94-74,59 %), lo que indica que los liposomas inducen la agregación de la proteína miofibrilar en los homogeneizados de merluza mediante su interacción con las proteínas musculares, una vez desplegadas por la adición del NaCl. Comparando la solubilidad de los homogeneizados con liposomas, en todos ellos estuvo en torno al 70 %, a excepción de los liposomas liofilizados, que mostraron valores del 55,94 % para LF y del 62,66 % para LF-G, indicativos de un mayor grado de agregación.

Esta reducción de la solubilidad proteica en las masas con LF y LF-G no fue consecuencia de las características de partícula de los liposomas, puesto que otros liposomas tanto de mayor como de menor tamaño obtuvieron mayor solubilidad y en todos los casos los potenciales de membrana fueron muy parecidos. Tampoco fue debida a sus menores valores de dispersabilidad en agua ya que los liposomas LF presentaron una mayor dispersabilidad en agua pero menor solubilidad proteica en la masa. La única diferencia destacable de estos liposomas fue su menor contenido en agua, siendo del 4,78 % para LF y del 14,87 % para LF-G. Por tanto, la mayor agregación proteica inducida por estos liposomas podría relacionarse con una mayor competitividad con las proteínas miofibrilares por las moléculas de agua, causando deshidratación y agregación del músculo. Este efecto no se observó con los liposomas atomizados (71,04 % de solubilidad proteica) probablemente porque éstos presentaron un mayor contenido en agua (19,20 %). Esto concuerda con la mayor solubilidad proteica de la masa con los liposomas desecados de mayor contenido de agua, los liposomas LF-G respecto a LF.

Capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua (Tabla 23) fue considerablemente más alta ($p \leq 0,05$) en las muestras que contienen liposomas que en el lote control. No se pudo establecer una relación clara entre este parámetro y la solubilidad de la proteína en las muestras estudiadas, pero los valores se correlacionaron inversamente con los valores de humedad ($r = -0,81$). En el lote control, que presentó la humedad más alta, probablemente se añadió demasiada agua (añadida para igualar el contenido al resto de las formulaciones), por lo que la proteína desplegada no fue capaz de retenerla adecuadamente. Por el contrario, en los lotes que contienen liposomas, las moléculas de agua podrían unirse eficientemente a los grupos de las cabezas polares en la superficie de la membrana de los liposomas, lo que podría aumentar el estado de hidratación general de la proteína miofibrilar circundante. Este efecto fue menos pronunciado en las preparaciones liposomales secas. La adición de glicerol a la formulación de liposomas redujo ligeramente ($p \leq 0,05$) el contenido de humedad en los músculos homogeneizados con sal

correspondientes (FT-G vs. FT y FD-G vs. D), con un aumento concomitante de la capacidad de retención de agua. En general, el tamaño de los liposomas o la carga de la membrana superficial no tuvieron un efecto significativo sobre la capacidad de retención de agua del músculo o la solubilidad de la proteína. Sin embargo, el bajo contenido de humedad en los liposomas deshidratados parece ser una característica más importante en la reducción tanto del agua ligada como del contenido de proteína soluble, probablemente al competir con las cadenas de proteínas por las moléculas de agua. Entre todos los lotes con liposomas, el que contenía el producto liofilizado (FD) presentó los valores más bajos tanto de agua ligada como de solubilidad de proteína.

Tabla 23. Contenido en agua (%), solubilidad proteica (%) y capacidad de retención de agua (%) de homogeneizados de músculo de merluza con sal control (MC) y con la adición de diferentes liposomas estabilizados. F: fresco; AP: alta presión; CD: congelado/descongelado; CD-G: congelado/descongelado con glicerol; LF: liofilizado; LF-G: liofilizado con glicerol; A: atomizado. Diferentes letras (a, b, c, d, e, f) en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre homogeneizados.

| | Contenido en agua (%) | Solubilidad proteica (%) | Capacidad de retención de agua (%) |
|------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| MC | 86,87 \pm 0,05 ^f | 78,95 \pm 0,98 ^e | 69,13 \pm 4,20 ^a |
| F | 84,59 \pm 0,06 ^c | 73,93 \pm 2,52 ^{cd} | 87,17 \pm 2,64 ^{cd} |
| AP | 84,39 \pm 0,04 ^b | 68,66 \pm 0,95 ^{bc} | 91,37 \pm 1,28 ^d |
| CD | 85,60 \pm 0,06 ^e | 74,59 \pm 0,96 ^{cd} | 82,10 \pm 3,88 ^{bc} |
| CD-G | 84,07 \pm 0,01 ^a | 69,30 \pm 0,73 ^{bc} | 92,12 \pm 1,75 ^d |
| LF | 84,91 \pm 0,03 ^d | 55,94 \pm 0,27 ^a | 76,02 \pm 2,02 ^b |
| LF-G | 83,98 \pm 0,06 ^a | 62,66 \pm 0,69 ^b | 83,78 \pm 2,52 ^c |
| A | 84,59 \pm 0,12 ^c | 71,04 \pm 4,69 ^c | 81,30 \pm 2,66 ^{bc} |

Perfil electroforético

El perfil electroforético en SDS-PAGE de la fracción soluble de los homogeneizados de merluza (Figura 63) reflejó la calidad de la proteína muscular desde un punto de vista cualitativo.

Todos ellos presentaron el mismo patrón de pesos moleculares, incluido el control (MC). Este patrón común se caracterizó por la predominancia de una banda muy intensa a ≈ 200 kDa asignada a la cadena pesada de la miosina, así como por la presencia de otras bandas minoritarias de pesos moleculares inferiores a 50 kDa asociadas con otros componentes proteicos miofibrilares importantes, como son actina, troponinas, tropomiosina y las cadenas ligeras de la miosina (Paredi et al., 2010). Además, una cierta cantidad de agregados proteicos que no entraron en el gel debido a su elevado peso molecular se observaron en todas las muestras en la parte superior del gel, en la zona de aplicación de la muestra. Estos resultados indican que, independientemente del tipo de preparación liposomal añadida, las proteínas miofibrilares se solubilizaron de un modo similar desde un punto de vista cualitativo, y sugieren que en esta fracción soluble no se dan interacciones covalentes proteína-lípido entre proteína muscular y liposomas. La menor solubilidad proteica de los homogeneizados con liposomas se atribuye a interacciones no covalentes, probablemente de puentes de hidrógeno entre las cadenas laterales de la proteína y los grupos polares de membrana de los liposomas o a moléculas de agua adheridas.

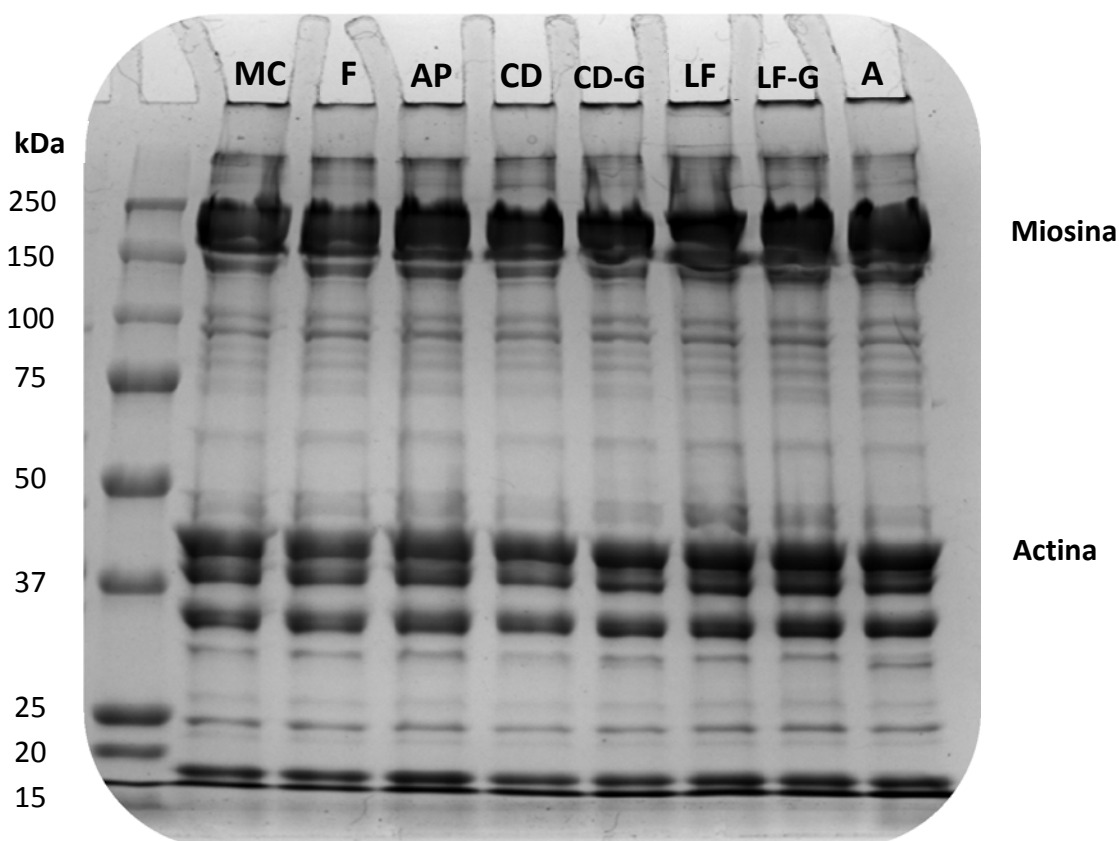


Figura 63. Perfil electroforético (SDS-PAGE) de la fracción soluble de homogeneizados de músculo de merluza con sal control (MC) y con la adición de diferentes liposomas estabilizados. F: fresco; AP: alta presión; CD: congelado/descongelado; CD-G: congelado/descongelado con glicerol; LF: liofilizado; LF-G: liofilizado con glicerol; A: atomizado.

La tabla 24 muestra el potencial zeta en la fracción soluble de las masas. El potencial zeta abarcó un estrecho rango desde -19,2 mV hasta -28,7 mV. Estos valores fueron ligeramente superiores a los obtenidos por Vate & Benjakul (2016) para soluciones de actomiosina procedentes de músculo de sardina.

Tabla 24. Índice de polidispersidad y zeta-potencial (mV) de la fracción soluble de homogeneizados de músculo de merluza con sal control (MC) y con la adición de diferentes liposomas estabilizados por dispersión dinámica de luz. F: fresco; AP: alta presión; CD: congelado/descongelado; CD-G: congelado/descongelado con glicerol; LF: liofilizado; LF-G: liofilizado con glicerol; A: atomizado. Diferentes letras (a, b, c, d, e) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre homogeneizados.

| | Índice de polidispersidad | Potencial Zeta (mV) |
|------|---------------------------|----------------------|
| MC | $0,871 \pm 0,112^b$ | $-20,8 \pm 1,4^{bc}$ |
| F | $0,881 \pm 0,094^b$ | $-19,2 \pm 2,2^c$ |
| AP | $0,795 \pm 0,105^{ab}$ | $-21,8 \pm 0,4^{bc}$ |
| CD | $0,816 \pm 0,062^{ab}$ | $-28,7 \pm 1,1^a$ |
| CD-G | $0,846 \pm 0,054^b$ | $-19,5 \pm 0,0^c$ |
| LF | $0,688 \pm 0,075^{ab}$ | $-24,5 \pm 1,3^b$ |
| LF-G | $0,623 \pm 0,043^a$ | $-21,2 \pm 2,7^{bc}$ |
| AP | $0,690 \pm 0,044^{ab}$ | $-24,2 \pm 1,0^b$ |

La carga neta electronegativa del músculo control MC (-20,8 mV) podría ser el resultado de la desprotonación de los aminoácidos ácidos, como el ácido glutámico y el ácido aspártico, los cuales son abundantes en el músculo de pescado. La carga electronegativa correspondiente a los homogeneizados con liposomas no mostró diferencias ($p \leq 0,05$) con el control, excepto con las vesículas que fueron congeladas y descongeladas (CD) (-28,7 mV), a pesar de la fuerte carga electronegativa de los liposomas. Estos resultados pueden indicar que se están produciendo repulsiones electrostáticas entre las cargas negativas de los grupos carboxilo de las proteínas musculares y los grupos fosfato de las cabezas polares de la membrana de los liposomas (que hacen que el potencial negativo no varíe), ocasionando que los cambios conformacionales por la interacción entre ambos componentes sean mínimos.

Caracterización de agregados mediante dispersión dinámica de luz en Zetasizer

La técnica de dispersión dinámica de luz permitió un estudio más minucioso del tamaño de los agregados proteicos presentes en la fracción soluble de los homogeneizados, no evidenciado en el estudio electroforético.

Las fracciones solubles presentaron distribuciones de tamaños bimodales y trimodales (Figura 64), indicativas del elevado índice de polidispersidad de todos los homogeneizados (0,623-0,881). Se observó una primera población de menor intensidad con tamaños comprendidos entre 100-170 nm. Se descarta que este tamaño pueda ser debido a los liposomas libres de la fracción soluble, ya que la población también fue observada para la fracción soluble del homogeneizado control sin liposomas. Por tanto, esta población de pequeño tamaño se podría atribuir a la molécula de miosina, cuya longitud es de ≈ 164 nm (Lanier et al., 2013).

Se apreció una segunda población mayoritaria de amplio rango de tamaños entre 460-830 nm, probablemente atribuidos a agregados proteicos solubles, ya que se presentaron para todas las masas, incluida MC. Para esta población mayoritaria se observaron diferencias entre el lote control y el resto de homogeneizados, debidas en parte a la interacción de los liposomas con la matriz muscular. En cuanto a las masas con las dispersiones liposomales (Figura 64A), mientras que F y CD-G no mostraron diferencias con respecto al control MC (≈ 712 nm), CD incrementó el tamaño de esta segunda población hasta los ≈ 825 nm (además de incrementar la intensidad de este pico) y AP lo redujo hasta los ≈ 531 nm (reduciendo también la intensidad del pico), a pesar de tener las mismas propiedades de partícula que F. Además, AP presentó una tercera población asociada a agregados proteicos de gran tamaño ($\approx 5,5 \mu\text{m}$). Estos resultados en AP parecen indicar la desintegración de agregados proteicos en otros de menor tamaño paralelamente a la aparición de otros agregados de gran tamaño. Estas diferencias podrían deberse al procesamiento inicial de los liposomas de alta presión, que podría haber promovido la unión de moléculas de agua a la superficie de membrana mediante puentes de hidrógeno, afectando así a las interacciones proteína-proteína, creando mayor alteración conformacional proteica y dando lugar a agregados proteicos de mayor tamaño que en el resto de homogeneizados con dispersiones liposomales.

Por otro lado, los liposomas liofilizados (Figura 64B) modificaron en mayor medida la intensidad y el tamaño de estos agregados proteicos, reduciendo sus tamaños hasta los ≈ 459 nm. Los liposomas atomizados (Figura 64B), en cambio, mantuvieron el tamaño en ≈ 825 nm pero disminuyeron notablemente la intensidad de este pico. Estos tres liposomas secos (LF, LF-G y A) también presentaron agregados proteicos de elevado tamaño ($\approx 5,5 \mu\text{m}$). Estos resultados confirman la mayor alteración conformacional proteica en estos homogeneizados y estuvieron en concordancia con la baja solubilidad proteica encontrada en ellos, lo que sugiere que estos tres liposomas podrían dificultar la adecuada desnaturalización y solubilización de los músculos de merluza, dando lugar a estructuras más agregadas.

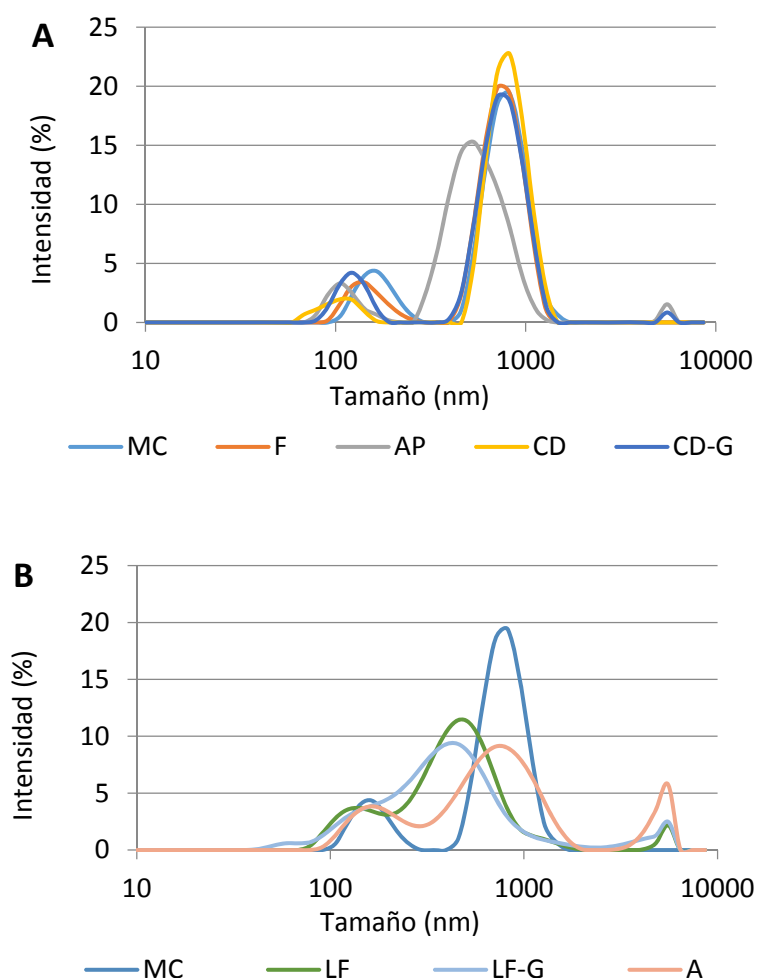


Figura 64. Distribución de tamaños de partícula de la fracción soluble de homogeneizados de músculo de merluza con sal control (MC) y con la adición de diferentes liposomas estabilizados por dispersión dinámica de luz. F: fresco; AP: alta presión; CD: congelado/descongelado; CD-G: congelado/descongelado con glicerol; LF: liofilizado; LF-G: liofilizado con glicerol; A: atomizado. A) Homogeneizados con dispersiones liposomales. B) Homogeneizados con liposomas en estado seco.

Resonancia Magnética Nuclear de Protón de Bajo Campo

La distribución de tiempos de relajación T2 analizada por relaxometría transversal mediante Resonancia Magnética Nuclear de Protón de Bajo Campo se muestra en la figura 65 y sus valores cuantificados en la tabla 25. Uno de los componentes principales de relajación T2 es T₂₁ (Figura 65A), que representa el agua localizada dentro de estructuras proteicas altamente organizadas. Este pico estuvo comprendido en un rango de 77,8-92,9 ms. Sánchez-Alonso et al. (2014) obtuvieron tiempos de relajación más cortos para músculos de merluza congelado y descongelado. Estas diferencias se deben principalmente a un desplegamiento inicial de la estructura proteica mediante la adición de NaCl (para permitir una mejor interacción de estas estructuras proteicas con los liposomas), lo que provoca una expansión de la red proteica y aumenta el tiempo de relajación de los protones de agua del espacio intramiofibrilar. El homogeneizado control (MC) fue el que presentó ($p \leq 0,05$) un menor tiempo de relajación (77,8 ms) y una menor amplitud de pico (105,3 %) respecto a los homogeneizados formulados con liposomas, lo que indica que la adición de estas vesículas aumenta el espacio entre las miofibrillas (mayor tiempo) lo que conlleva una mayor cantidad de agua atrapada dentro de la red proteica miofibrilar en estructuras altamente organizadas (mayor amplitud).

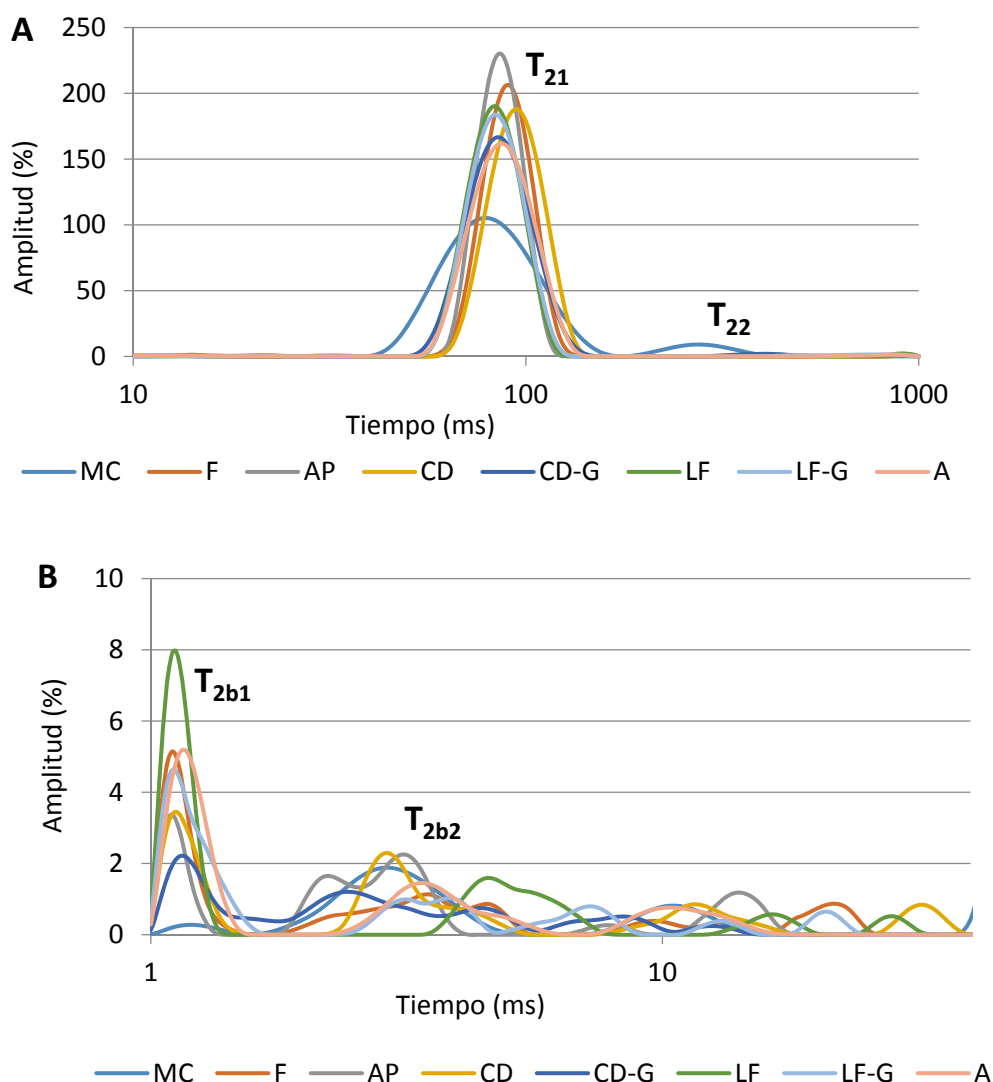


Figura 65. Curvas de distribución de tiempos de relajación T2 analizados mediante Resonancia Magnética Nuclear de Protón de Bajo Campo de homogeneizados de músculo de merluza con sal control (MC) y con la adición de diferentes liposomas estabilizados. F: fresco; AP: alta presión; CD: congelado/descongelado; CD-G: congelado/descongelado con glicerol; LF: liofilizado; LF-G: liofilizado con glicerol; A: atomizado. A) Picos T₂₁ y T₂₂. B) Picos T_{2b1} y T_{2b2}.

La otra componente principal de relajación, T₂₂ (Figura 65A), representa el agua extramiofibrilar y está asociada a cambios morfológicos y estructurales, los cuales por ejemplo Sánchez-Alonso et al. (2014) los relacionan con el proceso de congelación. Este pico mostró ($p \leq 0,05$) menor tiempo de relajación (273,3 ms) y mayor amplitud (9,0 %) para el homogeneizado control (MC), indicando que posee más agua extramiofibrilar en comparación con las formulaciones de las masas que contienen liposomas. De hecho, de estos últimos homogeneizados solo dos de ellos presentaron este pico T₂₂ (CD-G y LF-G), lo que significa que el agua extramiofibrilar en el resto de muestras es prácticamente inexistente.

Estas dos componentes de relajación reflejan el intercambio químico de agua y protones que se produce desde el interior de las miofibrillas (T₂₁) al exterior de las mismas (T₂₂) como consecuencia de la desnaturalización y agregación proteica (Hills et al., 1989). Los resultados obtenidos sugieren que la masa control, dado que presentó un pico T₂₁ de menor amplitud y tiempo de relajación y un pico T₂₂ de mayor amplitud, está perdiendo más cantidad de agua, que

sale desde el interior de sus miofibrillas al exterior, y da lugar a una estructura peor organizada. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en la capacidad de retención de agua, donde MC fue el que tuvo menos capacidad de ligar agua en el interior de su estructura, en comparación con los homogeneizados con liposomas.

Se observaron otros dos picos minoritarios de relajación en todas las muestras, T_{2b1} , que representa el agua fuertemente ligada a macromoléculas de la matriz muscular (Erikson et al., 2012), y T_{2b2} , que refleja el grado de disociación del miosistema (Figura 65B). Ambos picos mostraron un significativo menor tiempo de relajación y menor amplitud de pico en el homogeneizado control (1,0 ms y 1,0 % para T_{2b1} y 2,7 ms y 2,0 % para T_{2b2}) respecto a los homogeneizados formulados incluyendo liposomas (a excepción de la amplitud de T_{2b2} para CD y A), lo que significa que MC posee menos agua unida fuertemente a macromoléculas, lo que desestabiliza en mayor medida su estructura, y que los liposomas modifican el grado de disociación del músculo. Entre los homogeneizados con liposomas no se observaron diferencias significativas para estos dos picos minoritarios. Sin embargo, se podrían destacar los liposomas F (fresco) y AP (alta presión) ya que, en términos globales, tienden a presentar una mejor estabilidad estructural respecto al resto de formulaciones conteniendo liposomas.

Tabla 25. Parámetros de tiempos de relajación T2 (ms) y su amplitud (%) analizados mediante Resonancia Magnética Nuclear de Protón de Bajo Campo de homogeneizados de músculo de merluza con sal control (MC) y con la adición de diferentes liposomas estabilizados. F: fresco; AP: alta presión; CD: congelado/descongelado; CD-G: congelado/descongelado con glicerol; LF: liofilizado; LF-G: liofilizado con glicerol; A: atomizado. Diferentes letras (a, b, c, d, e) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre homogeneizados.

| | Tiempo (ms) | | | | | |
|------|--------------------|-----------------|------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| | T_{2b1} | T_{2b2} | T2 (3) | T_{21} | T_{22} | T2 (6) |
| MC | $1,0 \pm 0,0^a$ | $2,7 \pm 0,6^a$ | $10,0 \pm 0,0^a$ | $77,8 \pm 1,6^a$ | $273,3 \pm 11,6^a$ | - |
| F | $1,1 \pm 0,1^{ab}$ | $3,5 \pm 1,3^a$ | $16,0 \pm 5,5^a$ | $88,7 \pm 1,3^d$ | - | $900,0 \pm 0,0^b$ |
| AP | $1,1 \pm 0,0^{ab}$ | $2,8 \pm 0,4^a$ | $12,5 \pm 3,1^a$ | $85,0 \pm 0,7^c$ | - | $900,0 \pm 0,0^b$ |
| CD | $1,4 \pm 0,4^b$ | $5,0 \pm 3,4^a$ | $15,5 \pm 9,7^a$ | $92,9 \pm 1,1^e$ | - | $900,0 \pm 0,0^b$ |
| CD-G | $1,2 \pm 0,2^{ab}$ | $4,1 \pm 2,2^a$ | $10,5 \pm 2,1^a$ | $84,0 \pm 0,5^{bc}$ | $557,5 \pm 211,7^b$ | - |
| LF | $1,1 \pm 0,1^{ab}$ | $5,1 \pm 0,7^a$ | $20,0 \pm 8,2^a$ | $82,1 \pm 0,8^b$ | - | $890,0 \pm 14,1^b$ |
| LF-G | $1,2 \pm 0,1^{ab}$ | $4,3 \pm 1,9^a$ | $13,3 \pm 7,5^a$ | $82,7 \pm 1,1^b$ | $685,0 \pm 139,9^b$ | - |
| A | $1,2 \pm 0,1^{ab}$ | $3,5 \pm 1,0^a$ | $10,3 \pm 1,3^a$ | $85,4 \pm 0,3^c$ | - | $810,0 \pm 80,4^a$ |

| | Amplitud (%) | | | | | |
|------|---------------------|--------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|--------------------|
| | A_{2b1} | A_{2b2} | A (3) | A_{21} | A_{22} | A (6) |
| MC | $1,0 \pm 0,0^a$ | $2,0 \pm 0,0^a$ | $2,0 \pm 0,0^a$ | $105,3 \pm 7,4^a$ | $9,0 \pm 4,0^a$ | - |
| F | $5,3 \pm 2,1^{bcd}$ | $2,8 \pm 0,5^{ab}$ | $2,3 \pm 0,5^a$ | $206,3 \pm 30,3^{cd}$ | - | $1,5 \pm 0,6^{ab}$ |
| AP | $4,7 \pm 1,2^{bcd}$ | $4,5 \pm 1,7^b$ | $2,0 \pm 0,8^a$ | $230,0 \pm 13,2^d$ | - | $2,0 \pm 0,0^{bc}$ |
| CD | $2,8 \pm 2,2^{abc}$ | $2,0 \pm 0,8^a$ | $1,8 \pm 1,0^a$ | $187,3 \pm 14,0^{bc}$ | - | $1,0 \pm 0,0^a$ |
| CD-G | $2,3 \pm 1,3^{ab}$ | $3,0 \pm 0,8^{ab}$ | $1,5 \pm 0,7^a$ | $166,5 \pm 24,3^b$ | $3,3 \pm 1,0^b$ | - |
| LF | $8,0 \pm 0,8^d$ | $2,8 \pm 1,0^{ab}$ | $1,0 \pm 0,8^a$ | $189,8 \pm 11,6^{bc}$ | - | $2,3 \pm 0,5^c$ |
| LF-G | $5,8 \pm 2,2^{cd}$ | $2,5 \pm 1,3^{ab}$ | $2,3 \pm 0,6^a$ | $184,0 \pm 16,4^{bc}$ | $3,3 \pm 1,0^b$ | - |
| A | $5,5 \pm 1,0^{bcd}$ | $2,0 \pm 0,0^a$ | $1,3 \pm 0,5^a$ | $161,3 \pm 7,8^b$ | - | $2,0 \pm 0,0^{bc}$ |

Calorimetría Diferencial de Barrido

Las propiedades térmicas analizadas por Calorimetría Diferencial de Barrido de los homogeneizados de merluza con liposomas se muestran en la figura 66.

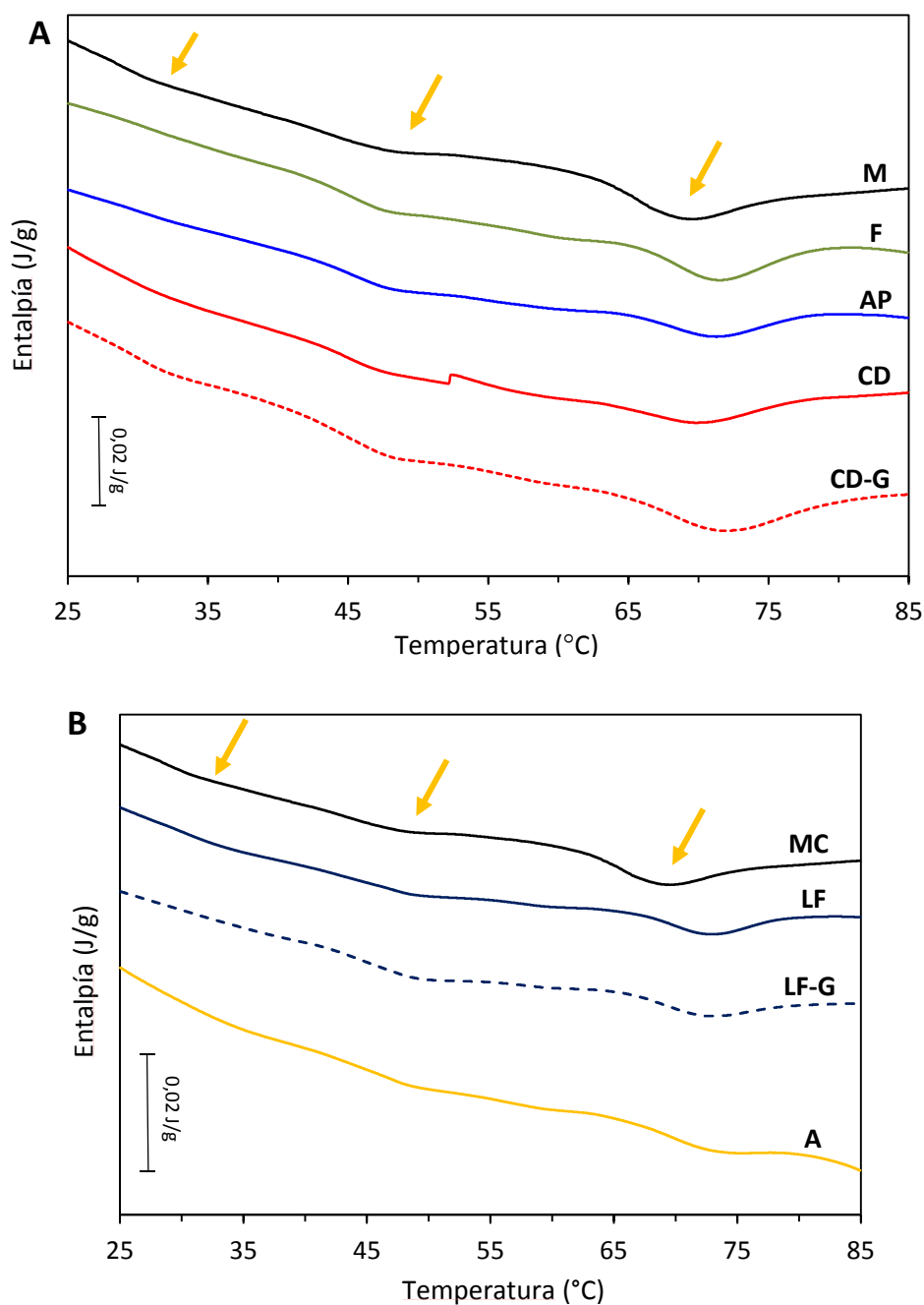


Figura 66. Termogramas reflejando las transiciones de fase mediante los cambios de temperatura (T , °C) y entalpía (ΔH , W/g) analizados por Calorimetría Diferencial de Barrido de homogeneizados de músculo de merluza con sal control (MC) y con la adición de diferentes liposomas estabilizados. F: fresco; AP: alta presión; CD: congelado/descongelado; CD-G: congelado/descongelado con glicerol; LF: liofilizado; LF-G: liofilizado con glicerol; A: atomizado. A) Homogeneizados con dispersiones liposomales. B) Homogeneizados con liposomas en estado seco.

Tres transiciones de fase endotérmicas se observaron para el homogeneizado control (MC): dos transiciones principales con eventos a 40,5 °C y 61,2 °C (temperaturas de inicio de la transición, T_0) asociadas a la desnaturalización térmica de la cola de la miosina y de la F-actina,

respectivamente. En realidad, el primer evento corresponde a la interacción de la miosina con la proteína del tejido conectivo (Careche et al., 2002). Una transición endotérmica minoritaria adicional, con una T_0 de 27,8 °C, se asigna al subfragmento S1 de la miosina. Estas transiciones aparecieron bastante difusas (picos no bien definidos) y desplazadas hacia menores temperaturas, tanto la miosina como la actina, respecto a las obtenidas por Beas et al. (1990) en músculo de merluza fresco. Este efecto, mucho más acusado en el caso de la cola de la miosina (segunda transición), se atribuye al proceso de solubilización y homogeneización del músculo con NaCl (Fernández-Martín et al., 1998). Esto significa que la F-actina resultó ser mucho más resistente a la desnaturalización inducida por sal que la miosina, hecho confirmado por su evento endotérmico más pronunciado.

La adición de liposomas al homogeneizado indujo un incremento notable ($p \leq 0,05$) de las temperaturas de las tres transiciones endotérmicas y un descenso de la entalpía, sugiriendo que los liposomas inducen un aumento de la estabilidad térmica tanto de la miosina como de la actina. El tipo de preparación liposomal no influyó en el comportamiento de la miosina tras su desnaturalización ya que no se observaron diferencias significativas en los dos primeros eventos endotérmicos: subfragmento S1 de miosina (27,8-31,5 °C) y cola de miosina (40,5-44,3 °C). En cambio, influyó en el comportamiento de la actina (tercer evento, 61,2-67,6 °C), donde la adición de liposomas secos (LF, LF-G y A) aumentó la temperatura de transición con respecto a la adición de dispersiones liposomales. Esta mayor estabilidad en estas tres masas fue consecuencia probablemente de su mayor grado de agregación proteica. Estos resultados coinciden con los observados en dispersión dinámica de luz para la fracción soluble del músculo, donde estos homogeneizados presentaron agregados proteicos de mayor tamaño como resultado de una solubilización proteica insuficiente.

Reología dinámica oscilatoria

El comportamiento viscoelástico reflejando los parámetros de módulo elástico (G') y módulo viscoso (G'') de los homogeneizados formulados con liposomas en función de un barrido de frecuencias desde 0,1 hasta 10 Hz a temperatura constante de 10 °C se muestra en la figura 67. En todas las formulaciones desarrolladas, incluyendo el control, el valor de G' fue siempre superior al de G'' , indicando que estas masas tuvieron un comportamiento viscoelástico típico de un gel (Badii & Howell, 2002).

Los parámetros viscoelásticos de módulo elástico (G'_0) determinado a 1 Hz, obtenido del barrido de frecuencias, y del valor del exponente n' , obtenido del ajuste del espectro mecánico de G' a la ecuación de la ley de la potencia ($R^2 > 0,99$), se muestran en la tabla 26.

Tabla 26. Parámetros viscoelásticos de G'_0 (Pa) y el valor de la ley de la potencia (n') cuantificados a 1 Hz y 10 °C de homogeneizados de músculo de merluza con sal control (MC) y con la adición de diferentes liposomas estabilizados. F: fresco; AP: alta presión; CD: congelado/descongelado; CD-G: congelado/descongelado con glicerol; LF: liofilizado; LF-G: liofilizado con glicerol; A: atomizado. Diferentes letras (a, b, c) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre homogeneizados.

| | G'_0 | n' |
|------|------------------------------|-----------------------------|
| MC | 3567,7 ± 97,6 ^{bc} | 0,134 ± 0,005 ^a |
| F | 2999,7 ± 53,4 ^b | 0,161 ± 0,001 ^{ab} |
| AP | 3350,0 ± 265,3 ^{bc} | 0,169 ± 0,006 ^{ab} |
| CD | 2043,8 ± 73,1 ^a | 0,175 ± 0,009 ^{ab} |
| CD-G | 3158,2 ± 79,5 ^b | 0,203 ± 0,033 ^b |
| LF | 4117,7 ± 359,4 ^c | 0,149 ± 0,017 ^{ab} |
| LF-G | 4172,5 ± 336,1 ^c | 0,156 ± 0,003 ^{ab} |
| A | 3459,3 ± 330,3 ^{bc} | 0,142 ± 0,016 ^a |

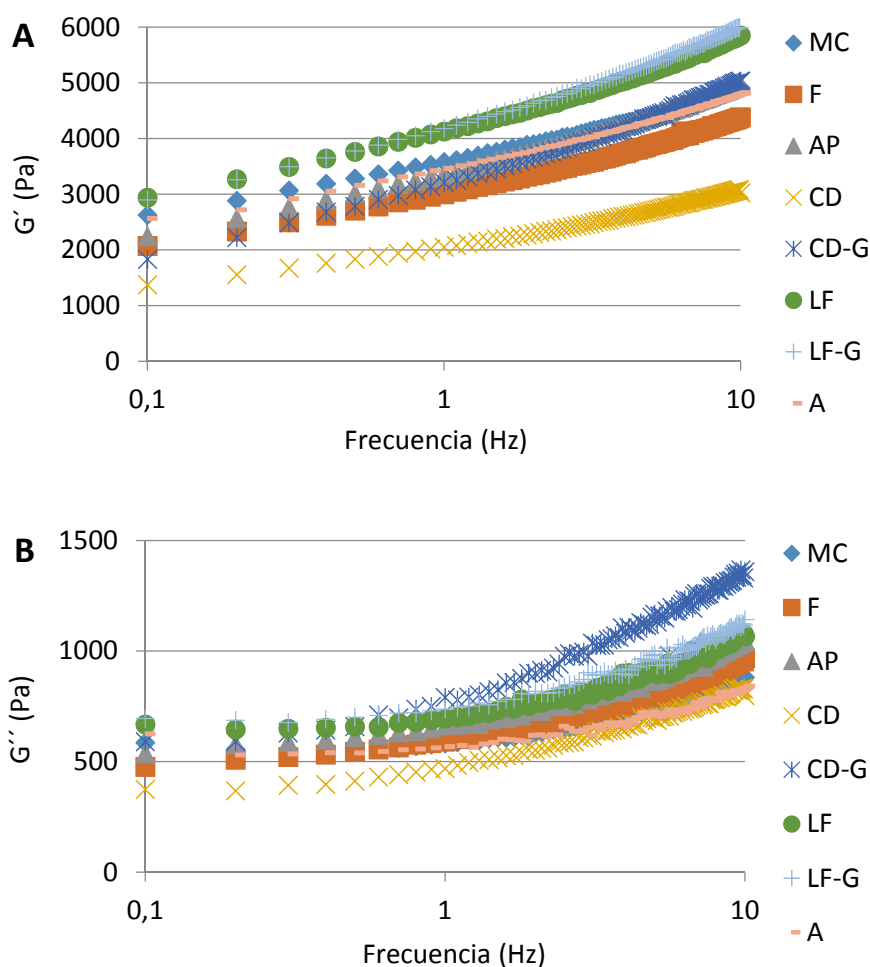


Figura 67. Comportamiento viscoelástico en función de un barrido de frecuencias (0,1-10 Hz) y temperatura constante (10 °C) de homogeneizados de músculo de merluza con sal control (MC) y con la adición de diferentes liposomas estabilizados. F: fresco; AP: alta presión; CD: congelado/descongelado; CD-G: congelado/descongelado con glicerol; LF: liofilizado; LF-G: liofilizado con glicerol; A: atomizado. A) Módulo elástico (G'). B) Módulo viscoso (G'').

La adición de las dispersiones liposomales en el músculo de merluza homogeneizado con sal indujo un descenso en la consistencia de gel (2043,8-3350,0 Pa) con respecto al control (3567,7 Pa), especialmente con la adición de la dispersión CD (2043,8 Pa). En cambio, los homogeneizados formulados con liposomas secos (LF y LF-G) experimentaron aumento ($p \leq 0,05$) de su G_0' (4117,7-4172,5 Pa) y, por tanto, de su consistencia de gel, con la excepción de las formulaciones con liposomas atomizados (3459,3 Pa), que no variaron con respecto a MC. Estos mismos resultados se observan también en la figura 67.

El valor de n' refleja la estabilidad estructural y conformación de la red proteica de tal modo que mayores valores de n' reflejan una mayor inestabilidad de la matriz proteica frente a cambios de frecuencia (Ojagh et al., 2011). Todos los homogeneizados formulados con liposomas mostraron un mayor valor de n' (0,142-0,203) respecto al control (0,134), lo que indica que los liposomas interfieren con las interacciones proteína-proteína de la matriz muscular y crean en ella discontinuidad, lo que disminuye su estabilidad estructural. Este efecto de discontinuidad fue más pronunciado cuando los liposomas fueron incorporados como dispersiones liposomales (resultado que coincide con sus menores valores de G' y su menor consistencia de gel), especialmente en CD-G (0,203), probablemente debido a que al añadirse en estado líquido

podrían acceder más fácilmente a las cadenas laterales proteicas que los liposomas secos, produciendo una mayor interferencia con las proteínas y mayor inestabilidad de la matriz muscular. Esta afirmación estaría en concordancia con los resultados obtenidos en Resonancia Magnética Nuclear, donde los homogeneizados con las dispersiones liposomales tuvieron un mayor valor de tiempo de relajación para el parámetro T_{21} , lo que demuestra que tienen más espacio intramiofibrilar y más capacidad de englobar agua en su interior.

El comportamiento viscoelástico del módulo elástico (G'), del módulo viscoso (G'') y del ángulo de fase (δ) de las masas en función de un barrido de temperaturas desde 15 °C hasta 80 °C, a frecuencia constante de 1 Hz, se muestra en la figura 68. La masa control (MC) mostró un perfil de agregación térmica de la proteína típico de la formación de un gel: desde el inicio del calentamiento hasta los ≈ 25 °C el músculo experimentó una primera desestabilización proteica asociada a la rotura de enlaces por puentes de hidrógeno sensibles al calor. Esta rotura de enlaces promueve el desplegamiento de la proteína y el que sus sitios reactivos queden más expuestos, lo que dio lugar a la subsecuente formación de nuevos enlaces intermoleculares hasta los ≈ 37 °C, momento en el que alcanzó valor máximo relativo de G' . Este pico es conocido como asentamiento o “setting”, fenómeno por el cual se forma una red proteica ordenada preliminar, estabilizada mediante interacciones proteína-proteína relativamente fuertes, predominantemente interacciones hidrofóbicas y enlaces covalentes ϵ -(γ -glutamil)-lisina inducidos por la actividad transglutaminasa endógena (Lanier et al., 2013). Posteriormente, G' sufrió un descenso hasta los ≈ 47 °C, fenómeno conocido como *modori*. El *modori* consiste en la desintegración de la red proteica anterior debido a la actividad de proteasas activadas por calor. Finalmente, el homogeneizado aumentó nuevamente sus valores de G' hasta ≈ 78 °C, momento en el que se estabilizó y se formó una red proteica de gel termoestable compuesta principalmente por interacciones hidrofóbicas así como por enlaces covalentes disulfuro termoestables intra- e intermoleculares, el gel definitivo.

La adición de las dispersiones liposomales al músculo homogeneizado con sal provocó enormes cambios en el perfil de gelificación proteica. Su presencia, sin embargo, no modificó las temperaturas a las que se produjeron los fenómenos de asentamiento (actividad de la transglutaminasa endógena) y *modori* (degradación proteica autolítica), manteniendo las temperaturas de ambos picos a ≈ 40 °C y ≈ 47 °C, respectivamente. Sin embargo, su presencia inhibió la primera desestabilización proteica que tenía lugar en torno a 25 °C e indujo un aumento progresivo de la G' hasta el fenómeno de asentamiento. Este hecho provocó un incremento del valor de G' con respecto a MC desde el punto de asentamiento hasta la formación final del gel. De hecho, la temperatura a la que se alcanzó el mayor valor de G' (momento de formación de la red proteica organizada o gel) fue considerablemente inferior ($p \leq 0,05$) que la del control, siendo este valor de ≈ 60 °C frente a los ≈ 80 °C del control.

Estos resultados indican que las dispersiones liposomales llevaron a una gelificación proteica mucho más rápida, posiblemente como consecuencia del mayor espacio intramiofibrilar (T_{21}) y su mayor exposición de los sitios reactivos proteicos, lo que promueve un notable aumento de las interacciones hidrofóbicas inducidas por calor y de los enlaces covalentes disulfuro posteriores. Esta proliferación rápida y excesiva de interacciones proteicas fuertes dio lugar a una mayor discontinuidad de la matriz (como vimos en el comportamiento viscoelástico en función de la frecuencia) y a una red proteica de gel menos ordenada. Esta peor estructuración proteica conlleva a la formación de geles más débiles, hecho confirmado por los mayores valores de ángulo de fase (δ) en el momento de gelificación máxima (mayor G') observados para las masas formuladas con dispersiones liposomales (Figura 68C).

Por el contrario, cuando los liposomas se incorporaron en estado seco (LF, LF-G y A), el perfil de gelificación proteica de sus homogeneizados fue bastante similar al del control (MC). Las únicas diferencias reseñables fueron su mayor ángulo de fase en el punto de máxima gelificación

(mayor G'), lo que indica que también se obtuvieron geles más débiles al control, y que a partir de $\approx 55^\circ\text{C}$ su incremento de G' , que fue constante y progresivo hasta los 80°C desde el fenómeno de *modori*, fue más limitado, terminando su gelificación a la misma temperatura pero menor valor de G' que el control, probablemente debido al elevado grado de agregación proteica de estos homogeneizados con liposomas secos. Este resultado confirma la obtención de geles más débiles con respecto a la masa control, pero de mejor estructura proteica de gel que los obtenidos con las masas formuladas con dispersiones liposomales.

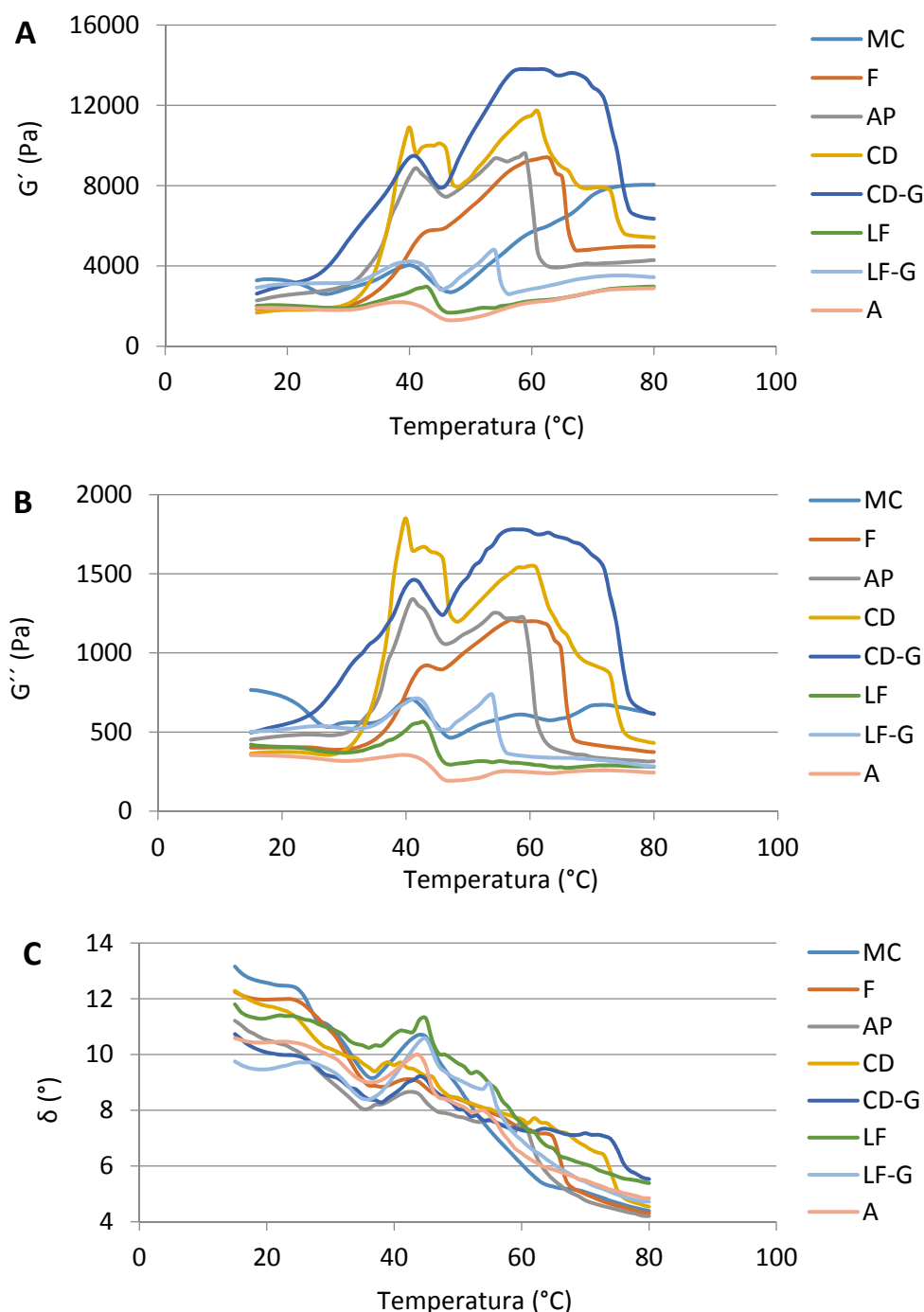


Figura 68. Comportamiento viscoelástico en función de un barrido de temperatura (15-80 °C) y frecuencia constante a 1 Hz de homogeneizados de músculo de merluza con sal control (MC) y con la adición de diferentes liposomas estabilizados. F: fresco; AP: alta presión; CD: congelado/descongelado; CD-G: congelado/descongelado con glicerol; LF: liofilizado; LF-G: liofilizado con glicerol; A: atomizado. A) Módulo elástico (G'). B) Módulo viscoso (G''). C) Ángulo de fase (δ).

Propiedades mecánicas

Los parámetros de fuerza (N), deformación (mm) y fuerza de gel (N x mm) de los geles de merluza tanto a 60 °C como a 80 °C se muestran en la figura 69.

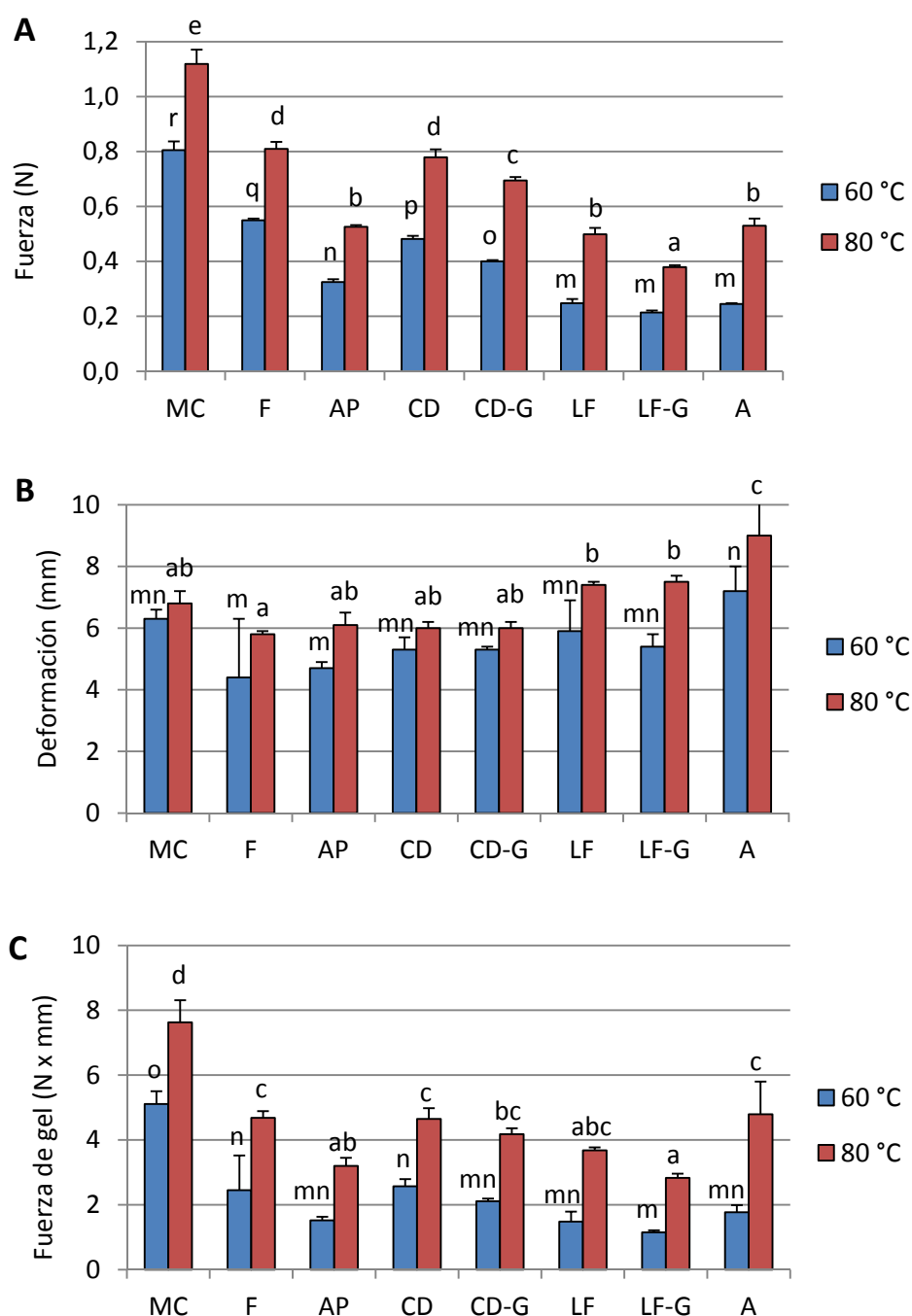


Figura 69. Propiedades mecánicas de los geles de músculo de merluza con sal control (MC) y con la adición de diferentes liposomas estabilizados. F: fresco; AP: alta presión; CD: congelado/descongelado; CD-G: congelado/descongelado con glicerol; LF: liofilizado; LF-G: liofilizado con glicerol; A: atomizado. Diferentes letras (a, b, c, d, e) indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre geles para una temperatura de 80 °C y (m, n, o, p, q, r) entre geles para una temperatura de 60 °C. A) Fuerza de rotura (N). B) Deformación (mm). C) Fuerza de gel (N x mm).

Se pretende evaluar si la gelificación está consolidada a 60 °C, o por el contrario continúa hasta temperaturas superiores. El gel control fue el que presentó una mayor fuerza de gel ($p \leq 0,05$) a

60 °C (Figura 69C) atribuida a su mayor fuerza de rotura (Figura 69A), puesto que no hubo diferencias significativas entre los geles para el parámetro de deformación (Figura 69B). Cardoso et al. (2010) obtuvieron una mayor fuerza de gel para geles a partir de homogeneizados de merluza calentados a 90 °C durante 1 h, probablemente debido en parte al menor contenido en agua encontrado en sus masas (80 % vs. 85 %) y a su mayor proporción de NaCl (2,5 % vs. 1 %). Estos resultados confirman que los liposomas interfieren en la agregación térmica de las proteínas del músculo y en la formación de una red proteica de gel adecuada, dando lugar a geles más débiles. No hubo diferencias significativas ($p>0,05$) entre homogeneizados con liposomas. Los geles formados a 80 °C siguieron el mismo comportamiento que los de 60 °C, donde el gel control presentó la mayor fuerza de gel y los liposomas AP, LF y LF-G la menor (con excepción de A), atribuidas estas diferencias a la fuerza de rotura y no a la deformación. Sin embargo, los geles a 80 °C mostraron una mayor fuerza de gel, fuerza de rotura y deformación que los geles a 60 °C, indicando que estos geles siguieron formándose desde los 60 °C hasta los 80 °C, reforzando su estructura.

Esta incongruencia con los resultados obtenidos en reología dinámica oscilatoria (donde concluimos que los geles que contenían las dispersiones liposomales completaban su formación a los 60 °C) podría deberse al diferente régimen de calentamiento en el proceso de formación de los geles. Mientras que en la reología dinámica oscilatoria el calentamiento fue lento y progresivo (aumentando 1 °C cada 1 min con un tiempo total de gelificación >1 hora), el proceso de gelificación para el estudio de las propiedades mecánicas de fuerza de gel fue más rápido e intenso desde el principio (45 min a temperaturas de 60 °C y 80 °C desde el comienzo de la gelificación). Estas diferencias podrían ser las responsables del diferente comportamiento térmico de los geles, determinando que alcancen su gelificación máxima a diferentes velocidades de calentamiento.

Conclusiones

Los tratamientos tecnológicos de estabilización indujeron cambios destacables en las propiedades de los liposomas, siendo la congelación el método que más incrementó el tamaño de partícula. El factor clave que determinó las interacciones musculares proteicas y la gelificación térmica del músculo homogeneizado fue el estado de hidratación de la preparación liposomal, más allá del tamaño de partícula o del potencial de membrana. En general la adición de liposomas al músculo de merluza previamente homogeneizado con sal contribuyó a aumentar la capacidad de retención de agua del sistema e interfirió en la gelificación térmica de la proteína. Las dispersiones liposomales indujeron una rápida gelificación favorecida por un mayor desplegamiento proteico durante la homogeneización con sal, al contrario que los liposomas añadidos en forma seca, los cuales dificultaron la correcta solubilización proteica con sal. A pesar de reducir ligeramente la fuerza de gel, las formulaciones de músculo de merluza con liposomas constituyeron una matriz adecuada para el desarrollo de productos de pescado basados en geles con un alto potencial nutricional y saludable.

8.6. AGREGACIÓN PROTEICA, AGUA LIGADA Y GELIFICACIÓN TÉRMICA DE MÚSCULO DE MERLUZA DE BAJA CALIDAD FUNCIONAL HOMOGENEIZADO CON SAL EN PRESENCIA DE LIPOSOMAS DE FOSFATIDILCOLINA DE SOJA CON TREALOSA SOMETIDOS A CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN Y LIOFILIZACIÓN

Resumen

Se elaboraron liposomas de fosfatidilcolina de soja utilizando trealosa como lioprotector y se sometieron a procesos de estabilización de congelación-descongelación (dispersión liposomal) y de liofilización (formato deshidratado). Posteriormente, dichos liposomas se incorporaron en un músculo de merluza (*Merluccius merluccius*) previamente homogeneizado con sal para estudiar su efecto en la agregación proteica, capacidad de retención de agua y gelificación térmica. Ambos tipos de liposomas, una vez resuspendidos, tuvieron un tamaño medio de partícula similar (≈ 215 nm) y un potencial de membrana electronegativo (-46 mV). La adición de ambos tipos de preparaciones liposomales en las formulaciones con músculo homogeneizado con sal dio lugar a más agua atrapada dentro de las miofibrillas, hecho que se observó tanto por la técnica de Capacidad de Retención de Agua como por Resonancia Magnética Nuclear de Protón de Bajo Campo. Sin embargo, los liposomas interfirieron fuertemente con la capacidad de gelificación térmica de la proteína muscular. El análisis de Calorimetría Diferencial de Barrido mostró que los liposomas indujeron un incremento de la temperatura de transición de fase, asociado a la molécula de actina, acompañado de una reducción de la entalpía total. La adición de liposomas disminuyó la dureza de los geles, sin embargo, el estado de hidratación de los liposomas con trealosa no resultó un factor clave en el perfil de gelificación térmica.

Palabras clave: homogeneizado de merluza, liposomas, trealosa, agua ligada, gelificación térmica.

Introducción

Tal y como se ha comentado en el anterior trabajo experimental, con el nuevo reglamento (01 Enero 2015, Reglamento UE 1380/2013) una vez que la cuota de captura de merluzas se ha agotado, cualquier merluza que llegue a puerto constituye un descarte, y no puede ser vendida para consumo directo. Ha de ser transformada bien para consumo animal o, lo que resultaría de mayor interés, transformado en producto reestructurado para consumo humano.

Tal y como se comentó en el apartado anterior, existen varios tratamientos para mejorar la estabilidad de los liposomas, como la congelación (Chen et al., 2010) o la liofilización (Sebaaly et al., 2016). Sin embargo, ambos tratamientos pueden dar lugar a la formación de agregados debidos a la fusión entre bicapas adyacentes. Los crio- y lioprotectores, tales como carbohidratos o polialcoholes, son incluidos en la preparación de liposomas para mejorar la estabilidad vesicular y evitar la agregación y sedimentación de partículas durante los procesos de congelación y liofilización (Stark et al., 2010; Wolkers et al., 2010). En particular, la trealosa es un efectivo lioprotector de liposomas debido a sus mecanismos de reemplazamiento de agua y vitrificación, aunque también podría contribuir con efectos de deshidratación osmótica y kosmotrópica (Chen et al., 2010). La cantidad de lioprotector, la composición lipídica y las condiciones de congelación y liofilización son factores determinantes en el tamaño final de las vesículas (Arshinova et al., 2012).

En trabajos experimentales previos se ha demostrado la importancia del estado de hidratación de los sistemas liposomales en las propiedades estructurales y gelificantes de músculo de merluza homogeneizado con sal y formulados con estos liposomas. Este comportamiento también podría estar influenciado por la calidad funcional inicial del músculo o por el tipo de

crio- o lioprotector añadido a la formulación liposomal, el cual puede modificar el estado de hidratación de las membranas y, como consecuencia, la interacción con la matriz muscular.

Objetivos

El segundo trabajo experimental de este capítulo tiene como objetivo evaluar el efecto de liposomas de fosfatidilcolina de soja, previamente procesados mediante tratamientos de congelación y de liofilización, utilizando trealosa como lioprotector, en la agregación proteica, capacidad de retención de agua y propiedades gelificantes de músculo de merluza previamente homogeneizado con sal.

Materiales y métodos

La fosfatidilcolina parcialmente purificada con cinco lavados de acetona (FC5) se extrajo de la lecitina de soja (LS).

Seguidamente, se prepararon los liposomas con fosfatidilcolina de cinco lavados (FC5). En este caso, se sustituyó el glicerol por la trealosa, pero a idénticas concentraciones y modo de inclusión. Las dispersiones liposomales se sometieron a congelación-descongelación (se congeló a -20 °C durante 24 h y después se descongeló a temperatura ambiente) y liofilización (previa congelación a -80 °C durante 24 h y posterior liofilización). Liposomas control sin tratamiento se estudiaron en paralelo. De este modo, se obtuvieron tres preparaciones liposomales distintas: fresco (F), congelado-descongelado conteniendo trealosa (CD-T) y liofilizado conteniendo trealosa (LF-T). De estos liposomas se caracterizaron sus propiedades hidrodinámicas mediante dispersión dinámica de luz en Zetasizer (77 mg/mL para los liofilizados y posterior dilución 1/10 para todos los liposomas) y su contenido en agua y dispersabilidad en agua.

Estos liposomas con trealosa se incorporaron en músculo de merluza fresco de diferente forma en función de su estado de hidratación. Las dispersiones liposomales (F y CD-T) se mezclaron con el músculo de merluza (1:2, v/p), previamente homogeneizado con sal (NaCl 1 %), y se homogeneizaron nuevamente durante 2 minutos. En cambio, para el liofilizado (LF-T) se añadieron 6,38 g de liposomas (en estado seco) al músculo previamente homogeneizado con sal (NaCl 1 %), homogenizándose de nuevo durante 1 min. Seguidamente, se añadió el agua correspondiente hasta establecer una proporción 1:2 (v/p) entre preparación liposomal y músculo, y se mezcló nuevamente durante 3 min más. De este modo, el músculo con la dispersión (CD-T) tuvo no solo la misma proporción preparación liposomal/músculo sino también el mismo peso seco de liposomas que el músculo con el liofilizado (LF-T). Una fórmula de homogeneizado de músculo con sal y agua (control) sin liposomas añadidos (MC) se estudió en paralelo.

Estas masas formuladas se caracterizaron en términos de contenido en agua y solubilidad proteica, retención de agua mediante la técnica de Capacidad de Retención de Agua y por Resonancia Magnética Nuclear de Protón de Bajo Campo, y propiedades físicas mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (directamente) y reología dinámica oscilatoria. Además, se determinó el perfil electroforético de la fracción de proteína soluble mediante SDS-PAGE, así como las propiedades hidrodinámicas de dicha fracción soluble mediante dispersión dinámica de luz en Zetasizer.

Finalmente, las masas de merluza (con y sin liposomas) se sometieron a un proceso de gelificación y se estudiaron sus propiedades mecánicas mediante texturometría.

Resultados y discusión

Caracterización de liposomas estabilizados

Características de partícula

Las características de partícula de los liposomas con trealosa se muestran en la tabla 27. Los liposomas sometidos a congelación (CD-T) y a liofilización (LF-T) mostraron un tamaño medio similar ($p > 0,05$), indicando que la presencia de trealosa no parece interferir en las propiedades de partícula de los liposomas según el método de estabilización. Estos tamaños fueron mayores ($p \leq 0,05$) que los de los liposomas frescos control (F), sugiriendo que ambos procesos de estabilización, junto posiblemente con la presencia de la trealosa, son responsables del incremento del tamaño medio. Ohtake et al. (2006) afirmaron que la interacción fosfolípidos-trealosa y su distribución a lo largo de la membrana liposomal es similar tanto en liposomas liofilizados como en liposomas rehidratados, no observando ningún incremento de partícula en vesículas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) en presencia de trealosa sometidas a congelación o liofilización. El incremento de partícula obtenido en nuestros liposomas podría deberse a una concentración insuficiente de trealosa o a su irregular distribución a lo largo de la membrana (Christensen et al., 2007).

Tabla 27. Tamaño (nm), índice de polidispersidad y potencial zeta (mV) de liposomas estabilizados con diversos procesados, donde F: fresco; CD-T: congelado/descongelado con trealosa; LF-T: liofilizado con trealosa. Diferentes letras (a, b) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre liposomas.

| | Tamaño (nm) | Índice de polidispersidad | Potencial Zeta (mV) |
|------|-------------------|---------------------------|---------------------|
| F | $141,3 \pm 1,9^a$ | $0,225 \pm 0,003^a$ | $-44,8 \pm 1,8^a$ |
| CD-T | $219,7 \pm 7,7^b$ | $0,277 \pm 0,030^b$ | $-45,8 \pm 2,9^a$ |
| LF-T | $210,0 \pm 3,5^b$ | $0,303 \pm 0,027^b$ | $-47,3 \pm 3,1^a$ |

El índice de polidispersidad siguió el mismo comportamiento que el tamaño, donde los liposomas frescos (0,225) presentaron un valor significativamente menor que los liposomas con trealosa (0,277 para CD-T y 0,303 para LF-T), sin diferencias ($p > 0,05$) entre ellos. Estos resultados fueron confirmados por el perfil de distribución de tamaños (Figura 70), donde se observó que los liposomas frescos presentaron una distribución bimodal que se convirtió en trimodal en liposomas con trealosa congelados/descongelados y liofilizados, aumentando el tamaño de ambas poblaciones y apareciendo una nueva población de mayor tamaño.

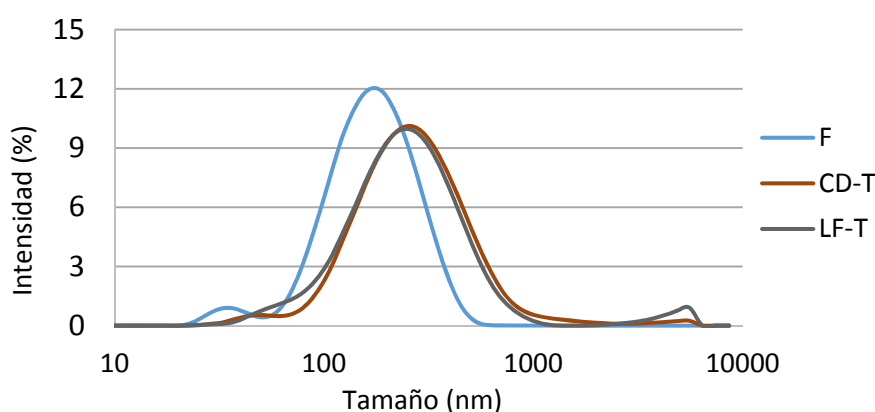


Figura 70. Distribución de tamaños de partícula de liposomas estabilizados con diversos procesados, donde F: fresco; CD-T: congelado/descongelado con trealosa; LF-T: liofilizado con trealosa.

El potencial zeta, en cambio, no mostró diferencias significativas en ninguna preparación liposomal, con valores comprendidos entre -44,8 mV y -47,3 mV, indicativos de una buena estabilidad de membrana.

Contenido en agua

El contenido en agua de los liposomas con trealosa congelados/descongelados y liofilizados se muestra en la tabla 28, siendo del 93,03 % para los liposomas frescos (F), del 91,60 % para los liposomas congelados (CD-T) y del 1,53 % para los liposomas liofilizados (LF-T). Esta última formulación presentó una apariencia de polvo fino blanquecino, indicativo de un adecuado proceso de deshidratación. Wolkers et al. (2010) propusieron que la trealosa ejerce un efecto protector en liposomas desecados a través del control de la tasa de pérdida de agua y la captura de agua alrededor de las cabezas polares de los fosfolípidos durante la fase inicial del secado.

Dispersabilidad en agua

La dispersabilidad en agua de los liposomas con trealosa congelados/descongelados y liofilizados se muestra en la tabla 28, con un rango de valores significativamente similares y muy elevados. Estos resultados indican que la agregación vesicular inducida por los procesos de congelación y liofilización fue baja, a pesar del notable incremento del tamaño de partícula en CD-T y LF-T.

Tabla 28. Contenido en agua (%) y dispersabilidad en agua (%) de liposomas estabilizados con diversos procesados, donde F: fresco; CD-T: congelado/descongelado con trealosa; LF-T: liofilizado con trealosa. Diferentes letras (a, b, c) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre liposomas.

| | Contenido en agua (%) | Dispersabilidad (%) |
|------|-------------------------------|-------------------------------|
| F | 93,03 \pm 0,01 ^a | 100,0 \pm 0,79 ^a |
| CD-T | 91,60 \pm 0,05 ^b | 95,24 \pm 5,95 ^a |
| LF-T | 1,53 \pm 0,31 ^c | 97,15 \pm 1,17 ^a |

Caracterización de homogeneizados de merluza formulados con liposomas

Contenido en agua

El contenido en agua de los homogeneizados de merluza conteniendo los liposomas con trealosa (congelados/descongelados y liofilizados) se muestra en la tabla 29. La masa sin liposomas mostró mayor contenido en agua (85,1 %) que aquellas con liposomas (82,3 % para CD-T y 82,8 % para LF-T), probablemente debido a que las fórmulas con liposomas CD-T y LF-T presentan una determinada cantidad de materia seca (la misma en ambos) correspondiente a los propios liposomas, mientras que a la fórmula control (MC) se le ha adicionado solamente agua y sal.

Solubilidad proteica

La solubilidad proteica de los homogeneizados de merluza con liposomas de trealosa estabilizados se muestra en la tabla 29. La fórmula control (MC) presentó una mayor ($p \leq 0,05$) solubilidad proteica (71,35 %) que la de los liposomas CD-T (49,17 %) y los liposomas LF-T (37,47 %). Estos resultados indican que la adición de liposomas aumenta el estado de agregación de la proteína miofibrilar. Aunque no hubo diferencias significativas entre las masas con liposomas, la adición de liposomas liofilizados al homogeneizado tendió a inducir una mayor deshidratación y agregación proteica, posiblemente debido a que establecen una mayor competitividad con las proteínas miofibrilares por las moléculas de agua.

Capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua de los formulados de merluza que contienen liposomas con trealosa, tanto congelados/descongelados como liofilizados, se muestra en la tabla 29. Los formulados con liposomas presentaron una mayor retención de agua (90,27 % para CD-T y 85,88 % para LF-T, sin diferencias significativas entre ellos) que el homogeneizado control (57,26 %). Estos resultados no coinciden con la solubilidad proteica y no dependen de las propiedades de partícula de los liposomas, ni del contenido en agua de los mismos, o de las diferentes formulaciones. Sin embargo, podrían atribuirse a que, a pesar de tener menor solubilidad proteica y por tanto los sitios de unión a las moléculas de agua menos expuestos, los liposomas presentes en estas masas permiten también la unión de moléculas de agua a sus grupos fosfato de la membrana, incrementando así el valor de retención de agua, incluso por encima del homogeneizado control.

Tabla 29. Contenido en agua (%), solubilidad proteica (%) y capacidad de retención de agua (%) de homogeneizados de músculo de merluza con sal control (MC) y con la adición de diferentes liposomas estabilizados. CD-T: congelado/descongelado con trealosa; LF-T: liofilizado con trealosa. Diferentes letras (a, b, c) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre homogeneizados.

| | Contenido en agua (%) | Solubilidad proteica (%) | Capacidad de retención de agua (%) |
|------|-----------------------|--------------------------|------------------------------------|
| MC | $85,11 \pm 0,13^c$ | $71,35 \pm 1,59^b$ | $57,26 \pm 2,44^b$ |
| CD-T | $82,28 \pm 0,02^a$ | $49,17 \pm 5,44^a$ | $90,27 \pm 1,86^a$ |
| LF-T | $82,79 \pm 0,11^b$ | $37,47 \pm 0,09^a$ | $85,88 \pm 1,73^a$ |

Perfil electroforético

El perfil electroforético (SDS-PAGE) de la fracción soluble de las diferentes masas formuladas con y sin liposomas se muestra en la figura 71.

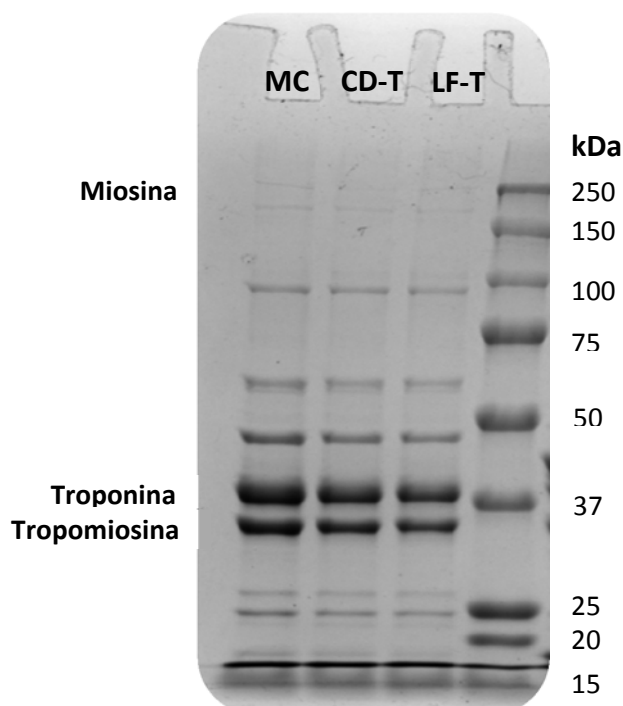


Figura 71. Perfil electroforético (SDS-PAGE) de la fracción soluble de homogeneizados de músculo de merluza con sal control (MC) y con la adición de diferentes liposomas estabilizados. CD-T: congelado/descongelado con trealosa; LF-T: liofilizado con trealosa.

Se caracterizó por la ausencia de la cadena pesada de la miosina (≈ 200 kDa), lo que significa que esta proteína se encuentra mayormente insolubilizada y el músculo no presenta elevada funcionalidad proteica. Otras bandas observadas de pesos moleculares inferiores corresponden muy probablemente a la actina soluble (<50 kDa) y a las proteínas troponina y tropomiosina (≈ 37 kDa). Se pudo apreciar un ligero descenso en la intensidad de las bandas asociadas a estas tres proteínas en el caso de los homogeneizados formulados con liposomas, de forma más acusada en LF-T, resultado que confirma la mayor agregación proteica en estas formulaciones y en concreto en los liposomas liofilizados (LF-T). Sin embargo, dado que el perfil electroforético no se ve afectado en cuanto al número y posición de las bandas, no existen signos evidentes de interacciones covalentes proteína-lípido en esta fracción soluble. La baja solubilidad proteica obtenida en las masas con liposomas podría deberse a interacciones no covalentes, probablemente de puentes de hidrógeno entre las cadenas laterales de las proteínas y los grupos polares de la membrana de los liposomas o a moléculas de agua adheridas. No se vieron agregados proteicos de elevado peso molecular en la parte superior del gel de poliacrilamida.

Caracterización de agregados mediante dispersión dinámica de luz en Zetasizer

La dispersión dinámica de luz se usó para obtener una idea de la distribución del tamaño de los agregados de proteína soluble en los diversos sistemas musculares (Figura 72), que no pudo ser evidenciado por el estudio electroforético.

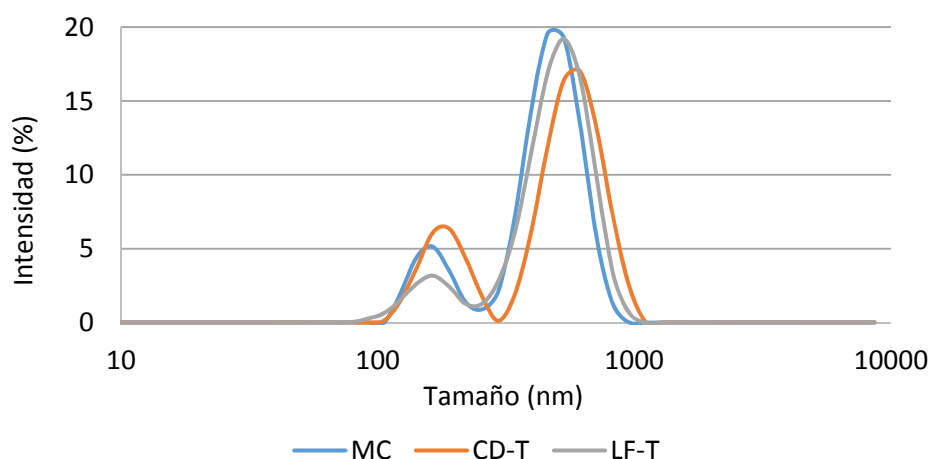


Figura 72. Distribución de tamaños de partícula de la fracción soluble de homogeneizados de músculo de merluza con sal control (MC) y con la adición de diferentes liposomas estabilizados por dispersión dinámica de luz. CD-T: congelado/descongelado con trealosa; LF-T: liofilizado con trealosa.

La proteína soluble de los tres sistemas musculares mostró una distribución de tamaño de agregados bimodal similar. La población predominante alcanzó un máximo en el rango entre 494 nm para la formulación control (MC) y 596 nm para el lote LF-T. Se encontró una escasa contribución de fragmentos proteicos más pequeños con un pico entre 159 y 182 nm. Los liposomas LF-T causaron un mayor desplazamiento del tamaño medio de los agregados que la preparación de CD-T. Sin embargo, la reducción notable en la intensidad del pico asociado con la población de agregados más pequeños en el lote de CD-T sugirió una disminución considerable en la presencia de estos pequeños fragmentos, que probablemente puedan haber entrado a formar parte de agregados de mayor tamaño que podrían haber pasado a la fracción insoluble de la proteína. Este hecho sería consistente con los valores encontrados para la solubilidad de la proteína ligeramente menor (Tabla 29) y la reducción de la intensidad de la banda de proteína (Figura 71) encontrada en el lote de CD-T.

Resonancia Magnética Nuclear de Protón de Bajo Campo

La distribución de tiempos de relajación analizados mediante relaxometría transversal T2 por Resonancia Magnética Nuclear de Protón de Bajo Campo se muestra en la figura 73 y sus valores se expresan en la tabla 30. La componente principal de relajación, T_{21} , que refleja el agua interior unida a estructuras proteicas altamente organizadas, presentó un valor de 85,4 ms para la fórmula de masa control (MC) (Figura 73A). Sánchez-Alonso et al. (2014) obtuvieron tiempos de relajación más cortos para la componente T_{21} de músculo de merluza congelado y sin congelar, probablemente debido al desplegamiento inicial de la estructura proteica inducido por NaCl, que expande la red proteica y aumenta así el espacio intramiofibrilar y el tiempo de relajación del agua. La otra componente de relajación importante, T_{22} , que refleja el agua extramiofibrilar, presentó un valor de 491,3 ms para la fórmula de masa control (MC). Esta componente suele aparecer en el rango de tiempos comprendido entre 120-360 ms, como resultado de cambios morfológicos en la proteína después de la congelación (Sánchez-Alonso et al., 2014).

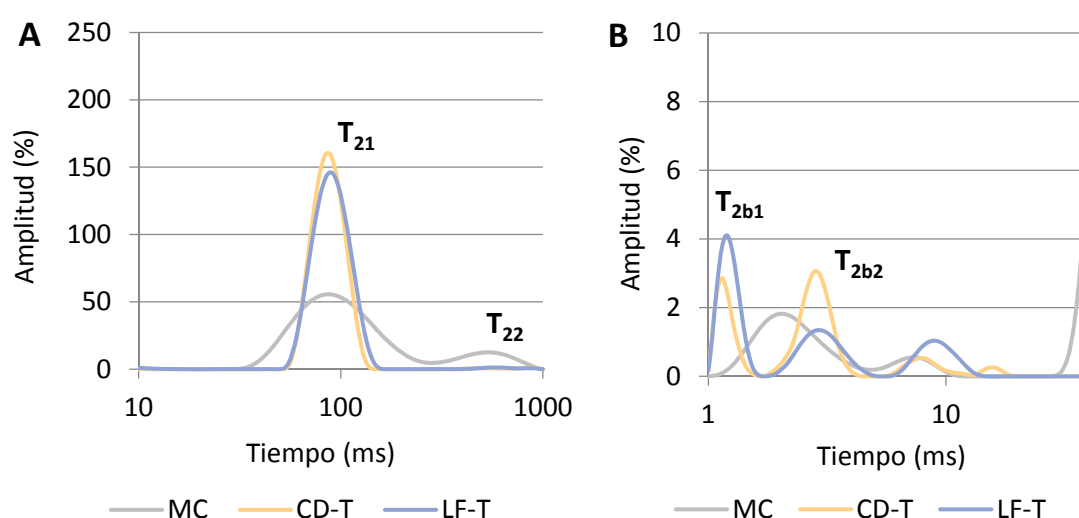


Figura 73. Curvas de distribución de tiempos de relajación T2 analizados por Resonancia Magnética Nuclear de Protón de Bajo Campo de homogeneizados de músculo de merluza con sal control (MC) y con la adición de diferentes liposomas estabilizados. CD-T: congelado/descongelado con trealosa; LF-T: liofilizado con trealosa. A) Picos T_{21} y T_{22} . B) Picos T_{2b1} y T_{2b2} .

La adición de liposomas al homogeneizado de merluza no modificó significativamente los tiempos de relajación de las componentes T_{21} y T_{22} . Sin embargo, los homogeneizados con liposomas mostraron una amplitud de pico de T_{21} notablemente mayor ($p \leq 0,05$) (160,5 % para CD-T y 145,8 % para LF-T) que la fórmula control (55,8 %), indicando que tienen más cantidad de agua unida a estructuras altamente organizadas. La componente T_{22} mostró una amplitud de pico mayor ($p \leq 0,05$) para la masa control (11,8 %) respecto a las masas formuladas con liposomas (2,3 % para CD-T y 2,0 % para LF-T), lo que significa que el control tuvo más agua extramiofibrilar y fue susceptible de más cambios morfológicos.

Estas dos componentes de relajación reflejan el intercambio químico de agua y protones que se produce desde el interior de las miofibrillas (T_{21}) al exterior de las mismas (T_{22}) como consecuencia de la desnaturalización y agregación proteica (Hills et al., 1989). Los resultados obtenidos sugieren que la masa control, dado que presentó un pico T_{21} de menor amplitud y un pico T_{22} de mayor amplitud, está perdiendo más cantidad de agua, que sale desde el interior de sus miofibrillas al exterior. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos para la capacidad de retención de agua, donde la masa control fue la que retuvo menos agua en el interior de su estructura, en comparación con las formulaciones con liposomas.

Tabla 30. Parámetros de tiempos de relajación T2 (ms) y su amplitud (%) analizados por Resonancia Magnética Nuclear de Protón de Bajo Campo de homogeneizados de músculo de merluza con sal control (MC) y con la adición de diferentes liposomas estabilizados. CD-T: congelado/descongelado con trealosa; LF-T: liofilizado con trealosa. Diferentes letras (a, b, c) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre homogeneizados.

| | T2 (1) | T2 (2) | T2 (3) | T2 (4) | T2 (5) |
|------|-----------------|--------------------|------------------|------------------|---------------------|
| MC | - | $2,1 \pm 0,3^a$ | $7,0 \pm 1,0^a$ | $85,4 \pm 3,0^a$ | $491,3 \pm 16,5^a$ |
| CD-T | $1,2 \pm 0,1^a$ | $2,7 \pm 0,5^{ab}$ | $10,5 \pm 3,9^a$ | $85,2 \pm 0,6^a$ | $705,0 \pm 183,8^a$ |
| LF-T | $1,2 \pm 0,1^a$ | $3,5 \pm 0,6^b$ | $9,3 \pm 1,5^a$ | $87,7 \pm 0,2^a$ | $665,0 \pm 153,5^a$ |

| | A (1) | A (2) | A (3) | A (4) | A (5) |
|------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|------------------|
| MC | - | $2,0 \pm 0,0^a$ | $1,0 \pm 0,0^a$ | $55,8 \pm 3,5^a$ | $11,8 \pm 1,5^a$ |
| CD-T | $2,8 \pm 1,0^a$ | $3,5 \pm 1,3^a$ | $1,0 \pm 0,8^a$ | $160,5 \pm 5,8^c$ | $2,3 \pm 0,5^b$ |
| LF-T | $3,8 \pm 1,5^a$ | $2,0 \pm 1,2^a$ | $1,5 \pm 0,6^a$ | $145,8 \pm 9,4^b$ | $2,0 \pm 0,0^b$ |

Otras dos componentes de relajación minoritarias (Figura 73B) son T_{2b1} , que representa el agua unida fuertemente a macromoléculas (Erikson et al., 2012), y T_{2b2} , que refleja el grado de disociación del músculo. La masa control (MC) presentó ausencia del pico T_{2b1} (ausencia de agua unida a macromoléculas) y menor tiempo de relajación para el pico T_{2b2} (diferente grado de disociación del músculo). Estos resultados sugieren cambios morfológicos de la proteína muscular en la masa control, lo cual se atribuye a la disociación con sal que ha sufrido durante el homogeneizado. Este evento aparentemente cambió hacia tiempos de relajación más altos en las formulaciones de las masas con liposomas (2,7 ms en LFT y 3,5 ms en CD-T), indicativos de cambios morfológicos en las proteínas, en especial las masas que contienen liposomas liofilizados (LF-T).

La amplitud ligeramente mayor de T_{21} en el lote FT-T coincidiendo con una mayor amplitud en el componente de T_{2b} parece ser consistente con una mayor cantidad de agua estrechamente unida a la proteína. Un nuevo componente más rápido que surge en 1,2 ms se podría relacionar directamente con la presencia de las vesículas de fosfolípidos, ya que no se detectó señal de resonancia en la formulación control (MC). Sin embargo, estudios previos con muestras similares mostraron que este pico sí aparecía en la formulación control, por lo que se descarta su relación estricta con las vesículas o los fosfolípidos.

Calorimetría Diferencial de Barrido

Las propiedades térmicas analizadas mediante Calorimetría Diferencial de Barrido de las formulaciones de los homogeneizados de merluza con y sin liposomas se muestran en la figura 74. El termograma de la masa control (MC) mostró tres transiciones de fase endotérmicas: dos de ellas minoritarias a temperaturas de 29,2 °C y 42,0 °C relacionadas con el subfragmento S1 de la miosina y con la cola de la miosina, respectivamente, y una principal a 69,4 °C asociada con la desnaturalización térmica de la F-actina. Las transiciones en la molécula de miosina fueron difusas debido a la desnaturalización de la proteína miosina como consecuencia del proceso de homogenización del músculo con NaCl (Fernández-Martín et al., 1998). La F-actina fue más resistente a la desnaturalización, como evidencia su evento térmico más pronunciado.

La adición de liposomas en los homogeneizados de merluza dio lugar a eventos térmicos asociados a la miosina más difusos y causó un incremento de la temperatura de transición asociada a la molécula de actina, con una disminución de la entalpía total. Estos resultados indican cambios estructurales notables en la proteína miofibrilar, causados por la interacción de

los liposomas con la matriz muscular. El tipo de preparación liposomal no produjo ningún cambio significativo en la desnaturalización de la miosina. Sin embargo, el aumento de la estabilidad térmica de la F-actina como consecuencia de la adición de liposomas fue más acusado cuando los liposomas fueron añadidos en estado seco (LF-T), probablemente debido a su mayor grado de agregación proteica resultado de la insuficiente solubilización de la estructura proteica cuando fue homogeneizado con NaCl, como corroboraron sus resultados de menor solubilidad proteica y menor cantidad de agregados de pequeño tamaño.

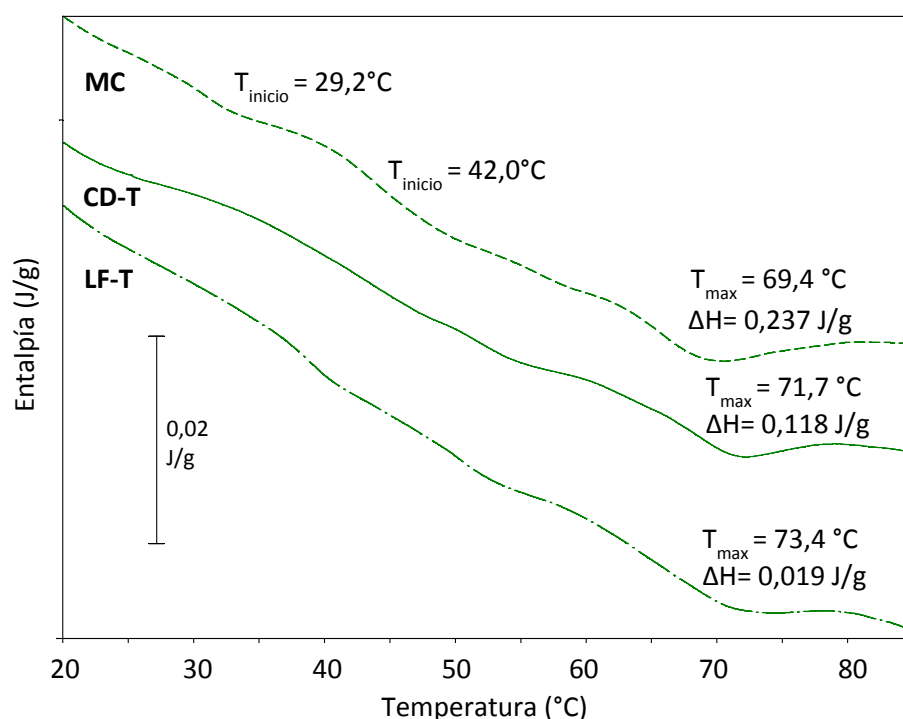


Figura 74. Termogramas reflejando las transiciones de fase mediante los cambios de temperatura (T , °C) y entalpía (ΔH , W/g) analizados mediante Calorimetría Diferencial de Barrido de homogeneizados de músculo de merluza con sal control (MC) y con la adición de diferentes liposomas estabilizados. CD-T: congelado/descongelado con trealosa; LF-T: liofilizado con trealosa.

Reología dinámica oscilatoria

El espectro mecánico de las masas con y sin liposomas reflejando el módulo elástico (G') y el módulo viscoso (G'') en función de un barrido de frecuencias de 0,1-10 Hz a temperatura constante de 10 °C se muestra en la figura 75. Los valores de G' prevalecieron sobre los de G'' , indicando que estos homogeneizados tuvieron un comportamiento viscoelástico típico de un gel (Badii & Howell, 2002).

Los parámetros del espectro mecánico de G'_0 , obtenido del barrido de frecuencias, y n' , obtenido del ajuste del espectro mecánico al modelo de la ley de la potencia ($R^2 > 0,99$), a 1 Hz de las diferentes formulaciones de masas de merluza con y sin liposomas se muestran en la tabla 31. La adición de liposomas incrementó el valor de G'_0 desde 2034,3 Pa hasta valores de 2655,7 Pa para CD-T y de 3645,6 Pa para LF-T; y el valor de n' desde 0,157 hasta 0,185 para CD-T y 0,161 para LF-T, indicando una mayor inestabilidad estructural en las masas que contienen liposomas, atribuida a su mayor valor de n' (Campos & Tovar, 2008). Esta inestabilidad fue más acusada en CD-T (mayor valor de n'), probablemente debido a que la dispersión liposomal puede acceder más fácilmente a las cadenas laterales de la proteína con respecto a la formulación liofilizada, induciendo una mayor discontinuidad de la matriz por su interferencia con las interacciones proteína-proteína.

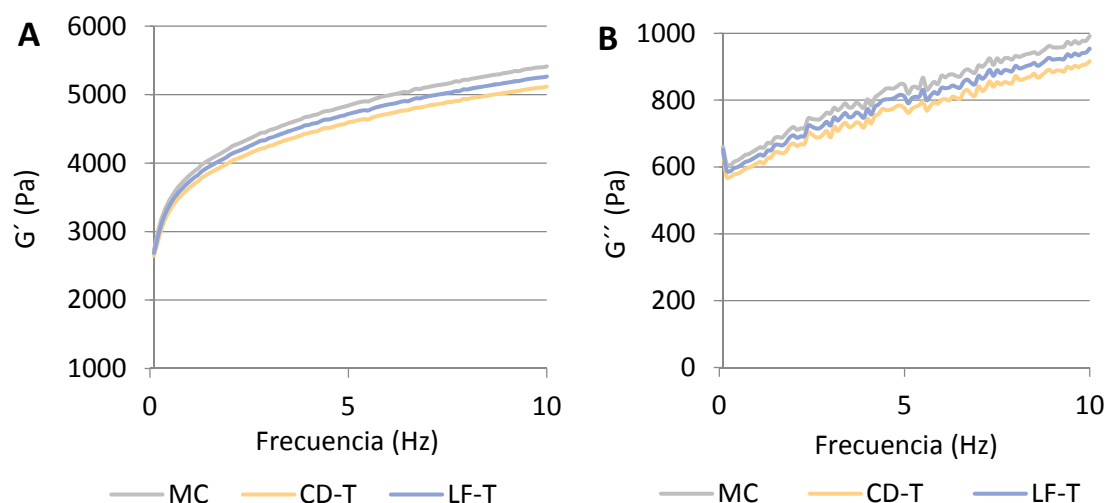


Figura 75. Comportamiento viscoelástico en función de un barrido de frecuencias (0,1-10 Hz) y temperatura constante (10 °C) de homogeneizados de músculo de merluza con sal control (MC) y con la adición de diferentes liposomas estabilizados. CD-T: congelado/descongelado con trealosa; LF-T: liofilizado con trealosa. A) Módulo elástico (G'). B) Módulo viscoso (G'').

Tabla 31. Parámetros viscoelásticos de G_0' (Pa) y valor de la ley de la potencia (n') medidos a 1 Hz y 10 °C de homogeneizados de músculo de merluza con sal control (MC) y con la adición de diferentes liposomas estabilizados. CD-T: congelado/descongelado con trealosa; LF-T: liofilizado con trealosa. Diferentes letras (a, b, c) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre homogeneizados.

| | G_0' (Pa) | n' |
|------|------------------------|---------------------|
| MC | $2034,3 \pm 138,2^a$ | $0,157 \pm 0,012^a$ |
| CD-T | $2655,7 \pm 44,4^{ab}$ | $0,185 \pm 0,001^a$ |
| LF-T | $3645,6 \pm 545,4^b$ | $0,161 \pm 0,009^a$ |

El comportamiento viscoelástico de los formulados de merluza con liposomas expresado mediante el módulo elástico (G'), el módulo viscoso (G'') y el ángulo de fase (δ) en función de un barrido de temperaturas de 15 a 80 °C, a frecuencia constante de 1 Hz, se muestra en la figura 76. El homogeneizado control presentó una caída pronunciada tanto de G' como de G'' (Figura 76A y 76B, respectivamente) entre 20 °C y 30 °C, atribuida a la desnaturalización proteica resultante de la rotura de puentes de hidrógeno sensibles al calor. Este efecto promovió el desplegamiento de la estructura proteica y la mayor exposición de sus sitios reactivos, lo que permitió la subsecuente formación de enlaces intermoleculares a temperaturas superiores. Este efecto fue más pronunciado en la masa control, lo que coincide con su mayor incremento tanto de G' como de G'' a elevadas temperaturas, en comparación con aquellas que contienen liposomas. En todas las muestras se observó un pico de G' a ≈ 38 °C, asociado con el fenómeno de asentamiento, que corresponde a una estabilización proteica preliminar mediante interacciones hidrofóbicas y enlaces covalentes ϵ -(γ -glutamil)-lisina inducidos por la actividad transglutaminasa endógena (Lanier et al., 2013). En torno a 45 °C se observó también en las tres muestras un pico conocido como fenómeno *modori*, caracterizado por la desintegración de la red proteica debido a la actividad de proteasas. El subsecuente aumento de G' y disminución del ángulo de fase (Figura 76C) en el rango de temperaturas de 45 °C a 80 °C indicó la formación de la red proteica de gel inducida por interacciones hidrofóbicas termoestables y enlaces disulfuro covalentes.

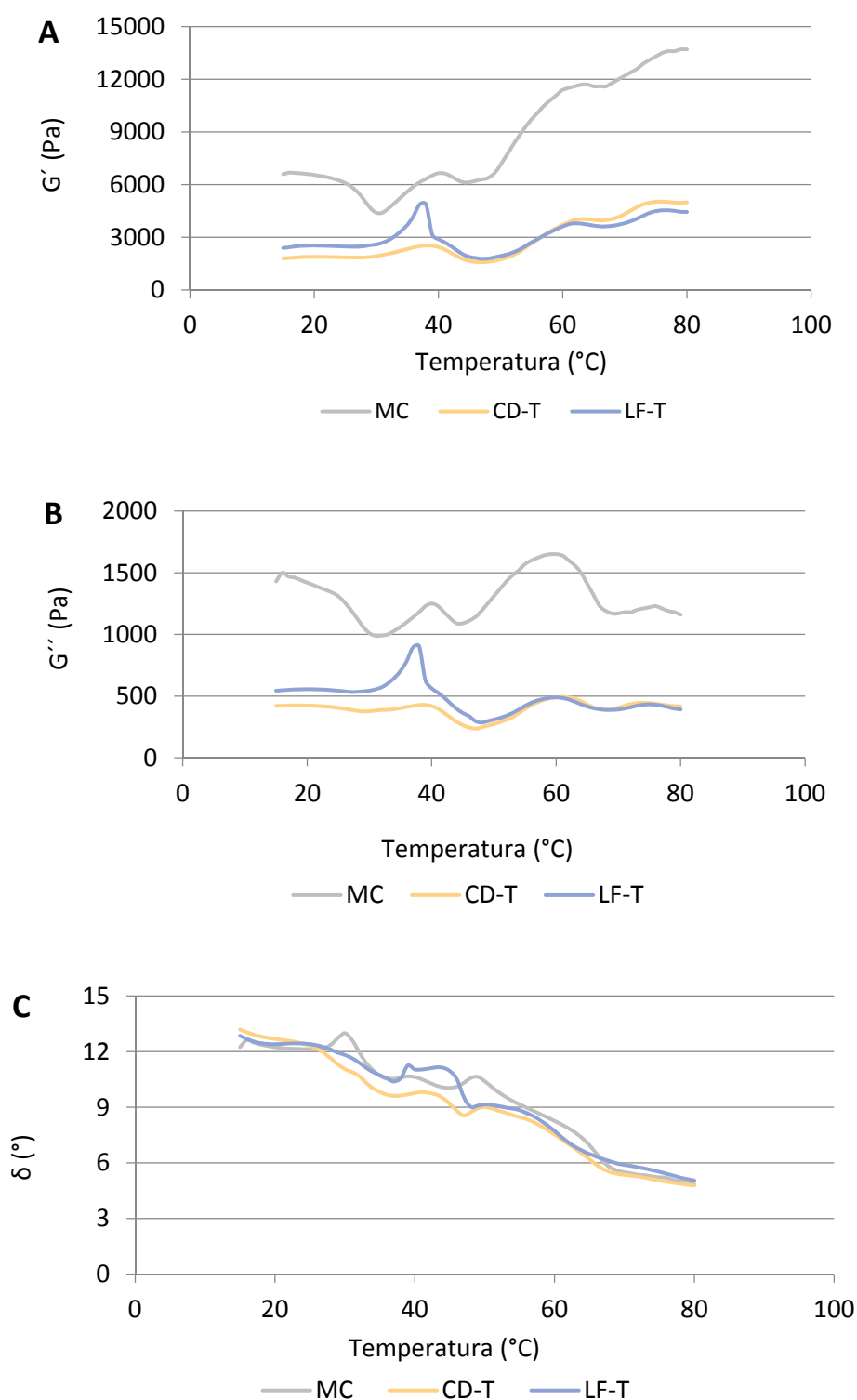


Figura 76. Comportamiento viscoelástico en función de un barrido de temperatura (15-80 °C) y frecuencia constante a 1 Hz de homogeneizados de músculo de merluza con sal control (MC) y con la adición de diferentes liposomas estabilizados. CD-T: congelado/descongelado con trealosa; LF-T: liofilizado con trealosa. A) Módulo elástico (G'). B) Módulo viscoso (G''). C) Ángulo de fase (δ).

La gelificación térmica tuvo lugar en dos fases: desde 45 °C hasta 60 °C se observó un aumento tanto de G' como de G'' , pero a mayores temperaturas el módulo viscoso (G'') empezó a disminuir, lo que indica que la matriz de gel ya ha completado su formación a los 60 °C. El

aumento progresivo de G' hasta los 80 °C podría deberse a un reforzamiento del gel atribuido a enlaces disulfuro covalentes. Por tanto, la presencia de liposomas no dificultó los fenómenos de asentamiento o modori y permitió mantener un perfil de gelificación similar al de la masa control. Sin embargo, difirieron esencialmente en que a partir de 55 °C el incremento de G' fue mucho más limitado. La presencia de liposomas contrarrestó la extensa formación de enlaces intermoleculares mediante su interferencia en las interacciones proteína-proteína. El mayor grado de agregación proteica en las formulaciones de las masas con liposomas añadidos dificultó la disponibilidad de los sitios reactivos de las proteínas para la posterior gelificación térmica de la proteína.

Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas en función de los parámetros de fuerza de rotura (N), deformación (mm) y fuerza de gel (N x mm) de los geles obtenidos a partir de las diversas masas de merluza con y sin liposomas se muestran en la figura 77.

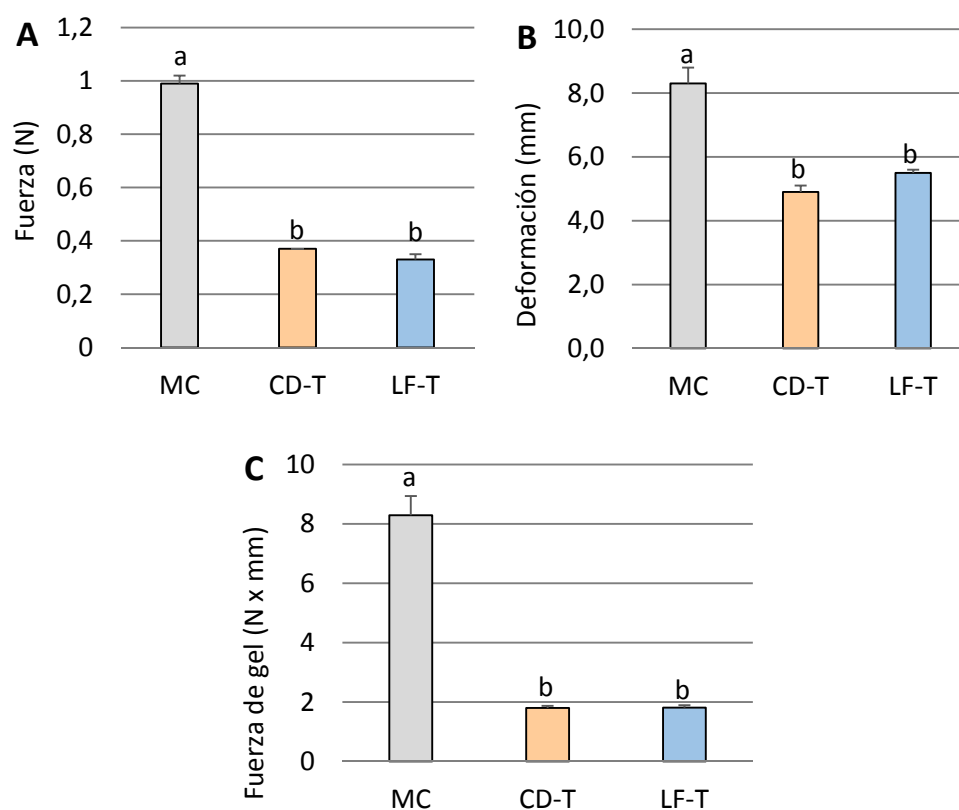


Figura 77. Propiedades mecánicas de los geles de músculo de merluza con sal control (MC) y con liposomas estabilizados. CD-T: congelado/descongelado con trealosa; LF-T: liofilizado con trealosa. Diferentes letras (a, b) indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre geles para una temperatura de 60 °C. A) Fuerza de rotura (N). B) Deformación (mm). C) Fuerza de gel (N x mm).

El gel control (MC) presentó la mayor fuerza de gel ($p \leq 0,05$) (Figura 77C) como resultado de su mayor fuerza de rotura (Figura 77A) y su mayor deformación (Figura 77B). El estado de hidratación de los liposomas no fue un factor determinante en las propiedades mecánicas de los geles, puesto que no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre CD-T y LF-T. Estos resultados estuvieron en concordancia con el similar comportamiento viscoelástico encontrado para estas dos muestras. Los resultados obtenidos confirman que la presencia de liposomas interfiere fuertemente con la formación de la red de gel, dando lugar a geles más débiles.

Cardoso et al. (2010) obtuvieron una mayor fuerza de gel en geles de merluza formados a 90 °C durante 1 h, probablemente debido a su menor contenido en agua (80 % vs. 85 %) y su mayor proporción de NaCl (2,5 % vs. 1 %).

Conclusiones

Los liposomas de fosfatidilcolina de soja con trealosa sometidos a congelación y liofilización tuvieron propiedades de partícula similares. Independientemente del estado de hidratación, los liposomas incrementaron la capacidad de retención de agua de los homogeneizados de merluza, pero dificultaron su capacidad de gelificación térmica mediante el incremento del estado de agregación de la proteína miofibrilar. El efecto de los liposomas en las propiedades mecánicas de los geles de pescado debería considerarse para el futuro diseño de productos de pescado funcionales.

8.7. LIPOSOMAS DE FOSFATIDILCOLINA LIOFILIZADOS ENCAPSULANDO VARIOS EXTRACTOS ANTIOXIDANTES A PARTIR DE RESIDUOS NATURALES COMO INGREDIENTES FUNCIONALES EN GELES DE SURIMI

Resumen

Se encapsularon tres extractos bioactivos antioxidantes (un hidrolizado de colágeno, un extracto de piel y albedo de granada y un extracto lipídico de langostino) en liposomas de fosfatidilcolina de soja con glicerol. El tamaño de partícula de las dispersiones osciló entre 75,7 y 81,0 nm y el potencial zeta desde -64,6 mV hasta -88,2 mV. La liofilización incrementó el tamaño de partícula hasta un rango de 199-283 nm y disminuyó ligeramente el potencial zeta. Los liposomas liofilizados se incorporaron en geles de surimi de calamar a una concentración del 10,5 %. Se preparó también una formulación funcional alternativa mediante la adición directa de los extractos bioactivos en el surimi (2 %), sin encapsular. Se caracterizó el color, la textura y la estabilidad oxidativa de los geles, recién procesados y tras un determinado tiempo de conservación en congelación. La incorporación de liposomas liofilizados causó una disminución de la fuerza de gel y contribuyó a mantener la estabilidad de los geles en el tiempo. También se determinaron las propiedades antioxidantes de los extractos bioactivos, liposomas y geles de surimi sometidos a una digestión *in vitro*.

Palabras clave: fosfatidilcolina de soja, liposomas, liofilización, geles de surimi, conservación, antioxidantes.

Introducción

Los consumidores buscan cada vez más un estilo de vida más saludable, haciendo que haya que prestar más atención a las dietas equilibradas, las cuales garantizan un buen estatus nutricional y la prevención de enfermedades crónicas. Hace algunos años las industrias alimentarias empezaron a incorporar ingredientes saludables en las comidas preparadas, también llamados “alimentos funcionales”, con el objetivo de proporcionar nutrientes importantes y otras sustancias bioactivas en la dieta. Los productos alimenticios con propiedades antioxidantes son adecuados para la prevención de diversas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, tales como enfermedades cardiovasculares o neurodegenerativas, diabetes y cáncer (Pham-Huy et al., 2008). Las materias primas a partir de residuos animales y vegetales representan una importante fuente de compuestos antioxidantes que se podrían incluir en la composición de los alimentos funcionales.

Los geles de surimi constituyen una matriz alimentaria idónea para la incorporación de ingredientes funcionales, dando lugar a productos con una gran versatilidad de presentación. Proporcionan una fuente de proteínas musculares capaces, tras su digestión gastrointestinal, de liberar péptidos con actividades biológicas (Ueki et al., 2014). Sin embargo, estas actividades pueden verse afectadas por degradación térmica durante el proceso de gelificación o por las interacciones excesivas con los componentes de la matriz (Montero et al., 2005b), afectando así a la bioaccesibilidad del compuesto bioactivo presente. Una manera de mejorar la eficacia y estabilidad de las sustancias bioactivas en sistemas alimentarios es la encapsulación en liposomas (Mozafari et al., 2008).

Las propiedades hidrodinámicas, eficacia de encapsulación y estabilidad de los liposomas con bioactivos varían en función de la naturaleza y concentración del bioactivo encapsulado (Tan et al., 2013). La incorporación de liposomas secos permite la posibilidad tecnológica de ajustar el contenido de agua del producto tipo gel resultante, lo que es de gran importancia para modular sus propiedades mecánicas.

Además, los fosfolípidos naturales de la soja pueden interaccionar con las membranas celulares, cambiando su composición de ácidos grasos. De este modo pueden actuar como ingredientes activos para el tratamiento de varias enfermedades, tales como procesos inflamatorios, riesgo cardiovascular, desórdenes neurológicos, cáncer, etc. (Küllenberg et al., 2012).

Objetivos

El tercer objetivo parcial de este capítulo fue encapsular tres extractos (hidrolizado de colágeno, extracto de piel y albedo de granada y extracto lipídico de langostino) en liposomas de fosfatidilcolina de soja, someterlos a liofilización y finalmente incorporarlos en geles de surimi. Se estudiaron las propiedades de partícula de los liposomas y el color, textura y estabilidad oxidativa de los geles de surimi (recién preparados y después de 3 y 7 meses de conservación en congelación). Estos geles se sometieron a una digestión gastrointestinal *in vitro* para determinar el potencial biológico de los correspondientes digeridos. También se analizó una formulación funcional alternativa basada en los extractos bioactivos incluidos directamente en las masas para elaborar los geles de surimi, sin encapsular en liposomas.

Materiales y métodos

La fosfatidilcolina parcialmente purificada con cinco lavados de acetona (FC5) se extrajo a partir de lecitina de soja (LS).

Por otro lado, se obtuvieron tres extractos bioactivos mediante diferentes procesos: un hidrolizado peptídico de colágeno (HC) procedente de tónicas del manto del calamar gigante *Dosidicus gigas*, un extracto polifenólico de piel y albedo de granada (PG) procedente de *Punica granatum*, y un extracto lipídico rico en astaxantina (GC) procedente de bioresiduos (cutículas, cefalotórax, telson, pleópodos y parápodos) del langostino *Litopenaeus vannamei*. Se llevó a cabo una caracterización composicional de cada uno de los extractos obtenidos.

Seguidamente, se elaboraron liposomas con glicerol a partir de fosfatidilcolina de cinco lavados (FC5). En este caso, los diferentes extractos bioactivos (HC, PG y GC) se encapsularon en los liposomas a una concentración final de bioactivo del $\approx 4,0\%$, incluyéndolos en la disolución inicial con la fosfatidilcolina. Se estudiaron las propiedades hidrodinámicas mediante dispersión dinámica de luz en Zetasizer (dilución 1/10). Estas dispersiones se liofilizaron y, tras ser resuspendidas, se caracterizaron sus propiedades hidrodinámicas mediante dispersión dinámica de luz en Zetasizer (77 mg/mL y posterior dilución 1/10), contenido en agua, dispersabilidad en agua y eficacia de encapsulación.

Finalmente, estos liposomas liofilizados se incorporaron en surimi de calamar. El surimi, previamente descongelado a 4 °C durante 24 horas, se homogeneizó con sal (NaCl, 1 %) a 2 °C con la cantidad de agua necesaria para obtener una humedad final del 80,5 % en el surimi. Los liposomas se añadieron (10 %; 28 % en base seca) a este homogeneizado de surimi y la mezcla se removió durante otros 5 min hasta su completa homogeneización. Las concentraciones finales de los componentes de los liposomas dentro del homogeneizado de surimi fueron de 0,15 % (0,60 % en base seca) de extracto bioactivo, 3,80 % (15,6 % en base seca) de fosfatidilcolina y 2,90 % (11,8 % en base seca) de glicerol. A continuación, los reestructurados se sometieron a un proceso de gelificación. Un gel control con liposomas sin extracto bioactivo (G-L-V) y un gel control sin liposomas ni bioactivo (G) se llevaron a cabo en paralelo. Los geles obtenidos (G-L-HC, G-L-PG y G-L-GC) se enfriaron en hielo 10 min y posteriormente se conservaron, un lote a 4 °C hasta su uso y otro a -20 °C, para realizar posteriormente estudios de estabilidad en estado congelado (0, 3 y 7 meses). Una formulación funcional alternativa se preparó en paralelo, consistiendo en los extractos bioactivos incluidos directamente en el surimi, sin presencia de liposomas (ni fosfatidilcolina ni glicerol). Estas formulaciones (G-HC,

G-PG y G-GC) se trataron y conservaron de manera análoga, constituyendo el bioactivo en este caso el 2 % (9 % en base seca) del total del homogeneizado o masa.

De estos geles de surimi obtenidos conteniendo liposomas liofilizados así como del gel de surimi control sin extractos se estudiaron sus propiedades de solubilidad proteica y color, propiedades mecánicas mediante texturometría, propiedades oxidativas mediante el índice tiobarbitúrico, y su estabilidad en congelación hasta un total de 7 meses (controles a 0, 3 y 7 meses) mediante estas mismas técnicas. De la formulación alternativa, es decir, aquella que contenía los extractos de manera libremente añadida como ingredientes en la masa para elaborar los geles, se caracterizó su propiedad física de color y el exudado aparente de agua. Por último, todos los geles (surimi control sin extractos y los geles con extractos, tanto añadidos directamente como encapsulados en liposomas, incluido el gel con liposomas vacíos) se sometieron a una digestión gastrointestinal *in vitro*, y se estudió la actividad antioxidante por los métodos de secuestro de radicales libres (ABTS), poder reductor del hierro (FRAP) y contenido de sustancias reactivas al Folin.

Resultados y discusión

Caracterización de los extractos bioactivos

El hidrolizado de colágeno (HC) liofilizado, con aspecto de un polvo fino blanquecino de muy bajo contenido en agua, presentó (Figura 78) una mayor proporción de los aminoácidos glicina (253 %), ácido glutámico (117 %), alanina (98 %) y ácido aspártico (92 %).

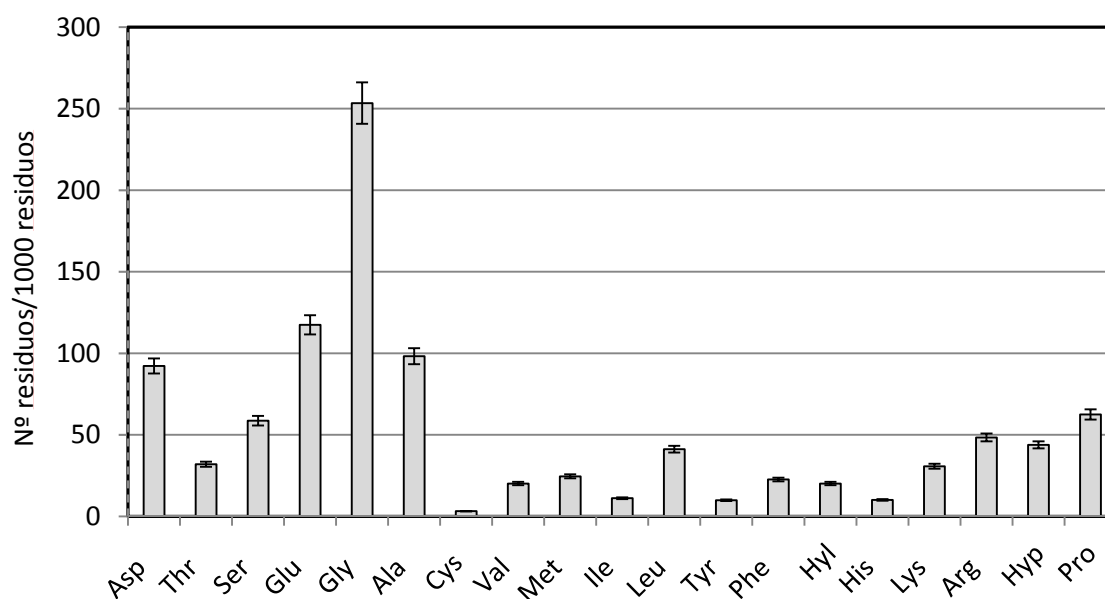


Figura 78. Composición de aminoácidos del extracto de hidrolizado de colágeno (HC).

La proporción de aminoácidos hidrofóbicos fue relativamente baja (28 %), muy inferior al 62 % obtenido por Mosquera et al. (2014) para un extracto de colágeno pero de diferente especie, ya que el de estos autores es de escamas de dorada y el del presente trabajo es de túnica de calamar, por lo que a pesar de ser la misma proteína puede mostrar diferente perfil aminoacídico. Esta baja proporción de aminoácidos hidrofóbicos podría ser consecuencia además del diferente método de extracción del hidrolizado. Mientras que el de los citados autores está hidrolizado con una endopeptidasa (Esperasa), el colágeno de túnica de calamar en la presente Memoria se hidrolizó con Alcalasa (endo- y exopeptidasa), con lo que se ha podido provocar que muchos aminoácidos de carácter hidrofóbico quedasen descartados como

aminoácidos libres. Se determinaron importantes cantidades de hidroxilisina (20 %) e hidroxiprolina (44 %) en el extracto HC, dado que son aminoácidos frecuentes en el colágeno.

El perfil de distribución de pesos moleculares del extracto HC (Figura 79) mostró cuatro rangos de pesos moleculares: 6500-1355 Da, 1355-502 Da, 502-75 Da y <75 Da, con diferente proporción para cada uno de ellos. El peso molecular predominante fue menor de 1355 Da, ya que la proporción entre 1355-502 Da fue del 47 %, y la proporción inferior a 502 Da supone un 42 %, y únicamente un 11 % es superior a 1355 Da.

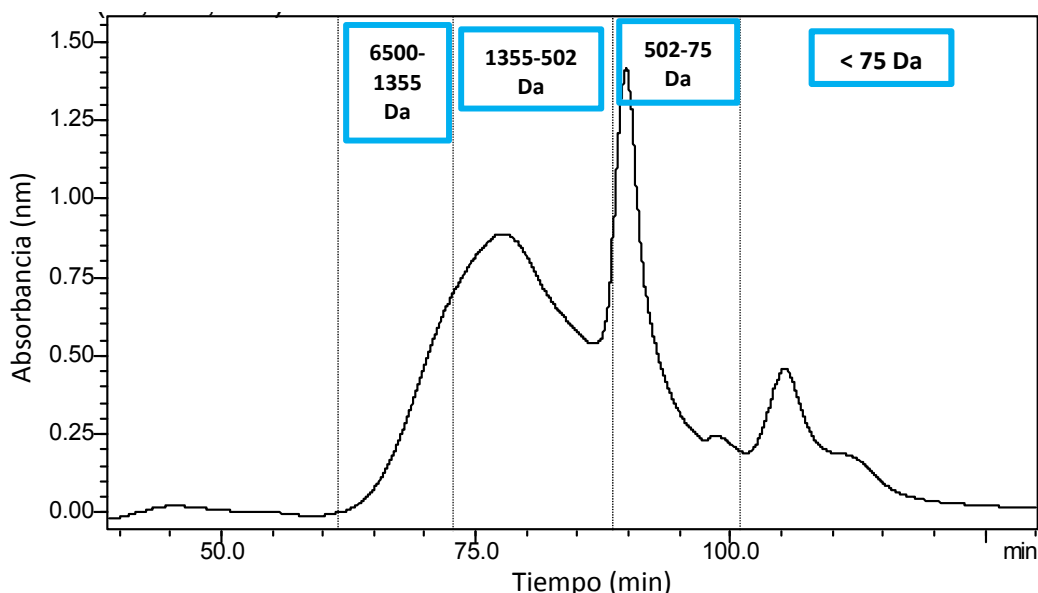


Figura 79. Distribución de pesos moleculares del extracto de hidrolizado de colágeno (HC).

El extracto de piel y albedo de granada (PG), desecado por rotaevaporación, consistió en un extracto polifenólico de color marrón/ocre y de textura similar a un caramelo, donde los principales compuestos bioactivos fueron, en orden descendente de intensidad de detección: β -punicalagina, ácido elágico, α -punicalagina, rutina y epigallocatequina (Figura 80). La presencia predominante de los polifenoles elagitaninos (punicalaginas y ácido elágico) en extractos de piel de granada fue previamente descrita por Sun et al. (2017).

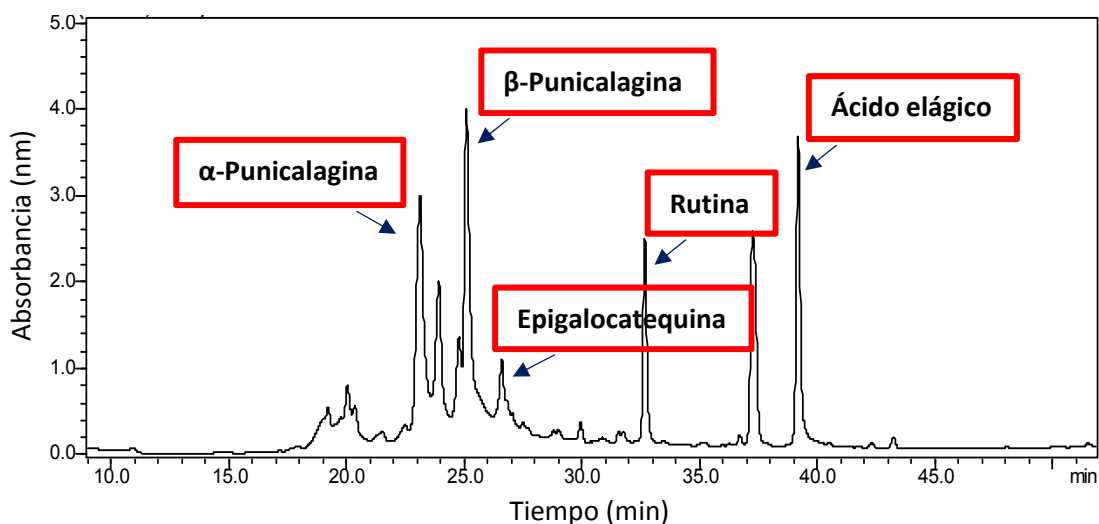


Figura 80. Perfil cromatográfico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (RP-HPLC) de los compuestos fenólicos principales presentes en el extracto de piel y albedo de granada (PG).

El extracto de grasa de crustáceo (GC) fue un extracto bioactivo de aspecto y textura líquido-viscosa con un perfil principalmente lipídico, por lo que el contenido en ácidos grasos así como otros componentes lipídicos fueron determinados mediante espectrometría de masas. La concentración de ácidos grasos (Tabla 32), determinada por cromatografía de gases en un trabajo previo, fue de 804 mg/g extracto, donde el 31 % fueron ácidos grasos saturados y el 69 % ácidos grasos insaturados (25 % monoinsaturados y 44 % poliinsaturados). Estos resultados confirman que nuestro extracto es muy rico en material lipídico (ácidos grasos) y que el grado de insaturación es bastante elevado. Otros componentes lipídicos presentes en el extracto fueron colesterol (65 mg/g), α -tocoferol (126 mg/g) y astaxantina (7 mg/g), tanto en forma libre como conformando mono y di-ésteres, siendo el compuesto responsable del característico color naranja del extracto. El mono-éster ácido docosahexaenoico fue el componente más abundante de la astaxantina (Gómez-Estaca et al., 2017).

Tabla 32. Composición lipídica del extracto de grasa de crustáceo (GC).

| | |
|---------------------|----------|
| Ácidos grasos: | 804 mg/g |
| Saturados | 31 % |
| Monoinsaturados | 25 % |
| Poliinsaturados | 44 % |
| Colesterol | 65 mg/g |
| α -tocoferol | 126 mg/g |
| Astaxantina | 7 mg/g |

Caracterización de liposomas encapsulando bioactivos

Características de partícula

Las características de partícula de los tres liposomas con glicerol encapsulando bioactivos, tanto en forma de dispersión liposomal (frescos) como liofilizados, se muestran en la tabla 33. Las dispersiones presentaron un tamaño nanométrico, con valores similares para L-PG (81,0 nm) y L-GC (80,3 nm) y ligeramente inferior ($p \leq 0,05$) para L-HC (75,7 nm). Otros autores obtuvieron tamaños similares, como Mosquera et al. (2016) para liposomas de fosfatidilcolina incorporando una fracción peptídica <1 kDa de túnica de calamar preparados por el método de hidratación de film; Charcosset et al. (2015) para liposomas conteniendo α -tocoferol preparados por el método de inyección de etanol; y Memoli et al. (1995) para liposomas de fosfolípidos de soja preparados por el método de sonicación. No se observaron diferencias ($p > 0,05$) en el índice de polidispersidad entre las tres dispersiones, con valores comprendidos entre 0,218 y 0,238, valores dentro del rango 0,2-0,3 esperados para sistemas preparados a partir de material biológico (Da Silva Malheiros et al., 2011). El potencial zeta de las dispersiones mostró cargas muy electronegativas, con valores de -68,4 mV para L-HC y -64,6 mV para L-PG. La dispersión L-GC destacó por presentar una carga mucho más electronegativa ($p \leq 0,05$) que las dos anteriores, con -88,2 mV. Estos resultados son indicativos de una excelente estabilidad de membrana, ya que, acorde a Müller et al. (2001), las dispersiones se consideran estables con valores inferiores a -30 mV.

Tras el proceso de liofilización y posterior rehidratación, el tamaño medio aumentó para los tres tipos de liposomas, donde L-HC (198,9 nm) siguió siendo el de menor tamaño ($p \leq 0,05$), seguido por L-PG (274,2 nm) y L-GC (282,9 nm). El índice de polidispersidad también se incrementó tras la liofilización hasta valores comprendidos entre 0,462-0,523, sin diferencias significativas ($p > 0,05$) entre liposomas. Estos cambios se vieron reflejados en la distribución de tamaños de partícula (Figura 81), donde las distribuciones típicamente monomodales de las dispersiones pasaron a ser bi- o trimodales en los liposomas liofilizados. El liofilizado L-HC mantuvo el 62 %

de las vesículas (expresado en intensidad) de un tamaño de 162 nm, en contraste con L-PG y L-GC, que registraron un 30 % de vesículas de 121 nm y un 26 % de vesículas de 111 nm, respectivamente. Además, estos dos últimos liposomas mostraron una tercera población de mayor tamaño (0,5-1,0 μm), lo que apoya sus mayores valores de tamaño medio.

Estos cambios inducidos por el proceso de liofilización ($p \leq 0,05$) son probablemente debidos a la rotura de puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua y los grupos polares de los fosfolípidos (Stark et al., 2010). Durante la liofilización, los liposomas son inicialmente concentrados por la propagación de hielo y seguidamente experimentan cambios en la membrana atribuidos a la eliminación del agua (Chen et al., 2010), desembocando en un fenómeno de agregación. Sin embargo, como muestran los resultados de la figura 81, un gran porcentaje de vesículas permanecen en el rango de la escala nanométrica (≈ 100 nm) incluso después de ser liofilizadas. El potencial zeta mantuvo una gran estabilidad de partícula y continuó muy electronegativo después de la liofilización y rehidratación de los liposomas, con valores comprendidos entre -58,5 mV y -62,9 mV.

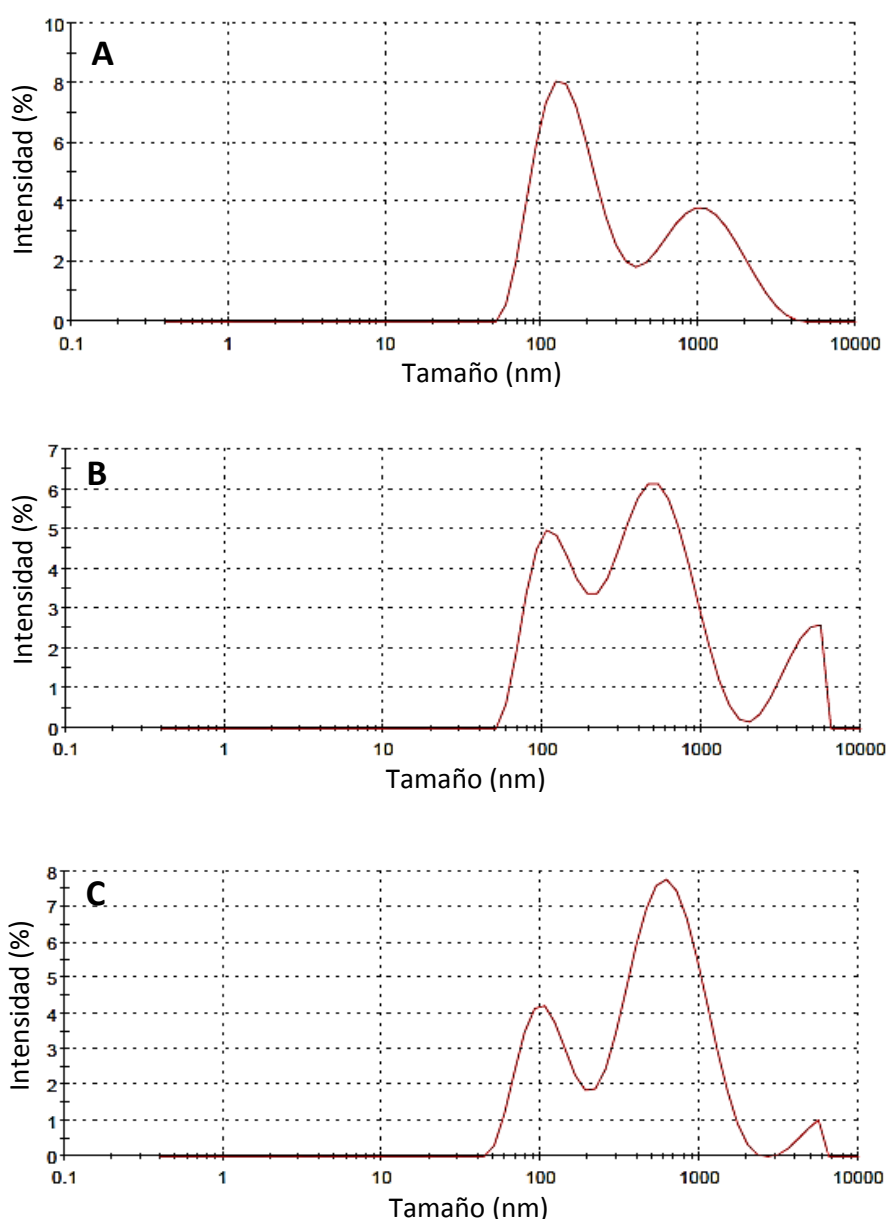


Figura 81. Distribución de tamaños de partícula de liposomas liofilizados encapsulando: A) hidrolizado de colágeno (L-HC), B) extracto de piel de granada (L-PG), C) extracto de grasa de crustáceo (L-GC).

Tabla 33. Tamaño medio (nm), índice de polidispersidad y potencial zeta (mV) de dispersiones liposomales y liposomas liofilizados encapsulando: hidrolizado de colágeno (L-HC), piel de granada (L-PG) y grasa de crustáceo (L-GC). Diferentes letras (a, b, c) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre liposomas en un mismo estado físico; y (x, y) en la misma fila entre una misma formulación liposomal en diferentes estado físicos.

| | | Dispersiones liposomales | Liposomas liofilizados |
|---------------------------|------|--------------------------|-------------------------|
| Tamaño medio (nm) | L-HC | $75,7 \pm 0,5^{a/x}$ | $198,9 \pm 2,8^{a/y}$ |
| | L-PG | $81,0 \pm 0,6^{b/x}$ | $274,2 \pm 3,3^{b/y}$ |
| | L-GC | $80,3 \pm 1,1^{b/x}$ | $282,9 \pm 2,3^{c/y}$ |
| Índice de polidispersidad | L-HC | $0,231 \pm 0,010^{a/x}$ | $0,462 \pm 0,035^{a/y}$ |
| | L-PG | $0,238 \pm 0,012^{a/x}$ | $0,518 \pm 0,029^{a/y}$ |
| | L-GC | $0,218 \pm 0,013^{a/x}$ | $0,523 \pm 0,037^{a/y}$ |
| Potencial zeta (mV) | L-HC | $-68,4 \pm 1,8^{a/x}$ | $-62,9 \pm 1,2^{b/x}$ |
| | L-PG | $-64,6 \pm 1,8^{a/x}$ | $-58,5 \pm 1,6^{a/y}$ |
| | L-GC | $-88,2 \pm 2,7^{b/x}$ | $-62,5 \pm 1,7^{b/y}$ |

Eficacia de encapsulación

La eficacia de encapsulación de los liposomas liofilizados varió en función del bioactivo encapsulado. El liposoma L-HC fue el que presentó una mayor tasa de encapsulación (95 %), probablemente debido al bajo peso molecular del extracto HC (mayoritariamente $<1,3$ kDa) y a la escasa cantidad de residuos hidrofóbicos. La mayor abundancia de péptidos hidrofílicos se situarían en el núcleo acuoso o adheridos a la superficie de membrana de los liposomas. Los liposomas L-GC mostraron una eficacia de encapsulación del 90 %, aunque en este caso, el bioactivo se localizaría preferentemente dentro de la bicapa dado su carácter lipofílico. Tan et al. (2013) obtuvieron similares resultados (82,64-91,98 %) para liposomas de fosfatidilcolina incorporando luteína. Los liposomas de piel de granada (L-PG) mostraron una tasa de encapsulación inferior a los dos anteriores, con un valor del 63 %, atribuida a una cierta cantidad de extracto no encapsulado. Hue et al. (2010) obtuvieron una tasa de encapsulación del 89 % para liposomas de lecitina de soja incorporando procianidina extraída de la piel de la granada. Los compuestos fenólicos polares del extracto de PG, tales como punicalagina y rutina, se localizarían preferentemente en el núcleo acuoso o asociados a las cabezas polares de los fosfolípidos. Sin embargo, el ácido elágico (poco soluble en solventes polares) quedaría intercalado en las cadenas alifáticas de la membrana, con una presumible baja eficacia de encapsulación. Los compuestos fenólicos son conocidos por interaccionar con los grupos polares y por intercalarse en la membrana de la bicapa lipídica (Pawlikowska-Pawłęga et al., 2014). La eficacia de encapsulación depende de la naturaleza y composición del material encapsulante, el método de preparación, la presencia de crioprotectores y la concentración y tipo de bioactivo (Tan et al., 2016).

Contenido en agua

En cuanto al contenido de agua de los liposomas liofilizados (Tabla 34), fue bastante elevado para todas las muestras (34,7-37,1 %), sin diferencias significativas ($p > 0,05$) entre liposomas. Estos resultados fueron muy superiores a los obtenidos por Van Winden et al. (1997), con un rango de 0,4-0,7 %. Este elevado porcentaje de contenido en agua se atribuye principalmente a la presencia de glicerol en la formulación liposomal (42 % en base seca). El glicerol se incluye en la formulación para proteger la estabilidad de los liposomas durante el proceso de liofilización mediante el mantenimiento de la integridad vesicular y la prevención de sedimentación y liberación del bioactivo (Mozafari, 2005). Sin embargo, el glicerol actúa como plastificante induciendo un incremento de la hidratación de las bicapas lipídicas (Manca et al., 2013), lo que

aumenta el contenido en agua de la muestra final y da lugar a liposomas con una apariencia gomosa (Stark et al., 2010).

Tabla 34. Contenido en agua (%) y dispersabilidad agua (%) de liposomas liofilizados encapsulando: hidrolizado de colágeno (L-HC), piel de granada (L-PG) y grasa de crustáceo (L-GC). Diferentes letras (a) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre liposomas.

| | | Liposomas liofilizados |
|-----------------------------|------|------------------------|
| Contenido en agua (%) | L-HC | $34,7 \pm 2,4^a$ |
| | L-PG | $37,1 \pm 5,0^a$ |
| | L-GC | $35,3 \pm 1,3^a$ |
| Dispersabilidad en agua (%) | L-HC | $82,2 \pm 1,0^a$ |
| | L-PG | $84,9 \pm 0,6^a$ |
| | L-GC | $83,1 \pm 0,3^a$ |

Dispersabilidad en agua

La dispersabilidad en agua de los liposomas liofilizados (Tabla 34) fue muy elevada para los tres liposomas, sin diferencias ($p > 0,05$) entre ellos. Estos valores fueron superiores al 80 % ($82,2-84,9$ %), indicando una muy buena dispersabilidad en agua. Estos resultados indican por un lado que el glicerol no afecta negativamente a esta propiedad liposomal y por otro que la estructura de liposomas mejora la dispersabilidad en agua del extracto de GC, a pesar de su fuerte naturaleza lipofílica. Peng et al. (2010) observaron los mismos resultados encapsulando astaxantina.

Caracterización de geles de surimi formulados con liposomas

Color

El gráfico reflejando los parámetros de color, cromaticidad y tonalidad, de los geles con y sin liposomas se muestra en la figura 82. La adición de los extractos HC y PG al surimi (G-HC y G-PG) modificó ligeramente sus valores de cromaticidad y tonalidad con respecto al gel control (G), sin diferencias entre geles que tienen incorporados los diferentes bioactivos como ingrediente de manera libre, sin añadirlo a liposomas. En cambio, la adición de GC (G-GC) modificó notablemente ambos parámetros con respecto al gel control y a los geles con HC y PG. Este gel con GC tuvo un mayor valor de cromaticidad y tonalidad comprendido en la región naranja-rojiza, debido a su llamativo color naranja, atribuido a la presencia de astaxantina presente en el extracto de grasa de crustáceo.

La adición de los bioactivos encapsulados en liposomas al surimi siguió un comportamiento diferente. Los geles que contienen liposomas de HC (G-L-HC) fueron muy similares al gel control (G), mientras que los geles que contienen liposomas de PG y GC (G-L-PG y G-L-GC) tuvieron un destacado mayor valor de cromaticidad y un menor valor de tonalidad que el control, diferencias atribuidas a los extractos bioactivos (ya sea la parte no encapsulada o la que queda adherida a la membrana externa). Una vez más la formulación con GC fue la más diferente del control. Los geles con liposomas vacíos (G-L-V) mostraron valores intermedios entre el control y los bioactivos encapsulados.

Si comparamos únicamente entre formulaciones con bioactivos, aquellas con el bioactivo añadido directamente en el surimi presentaron una ligera disminución del tono con respecto al control, y un mayor valor de cromaticidad (excepto las muestras de PG), reflejando una mayor saturación del color como consecuencia de la adición directa del bioactivo.

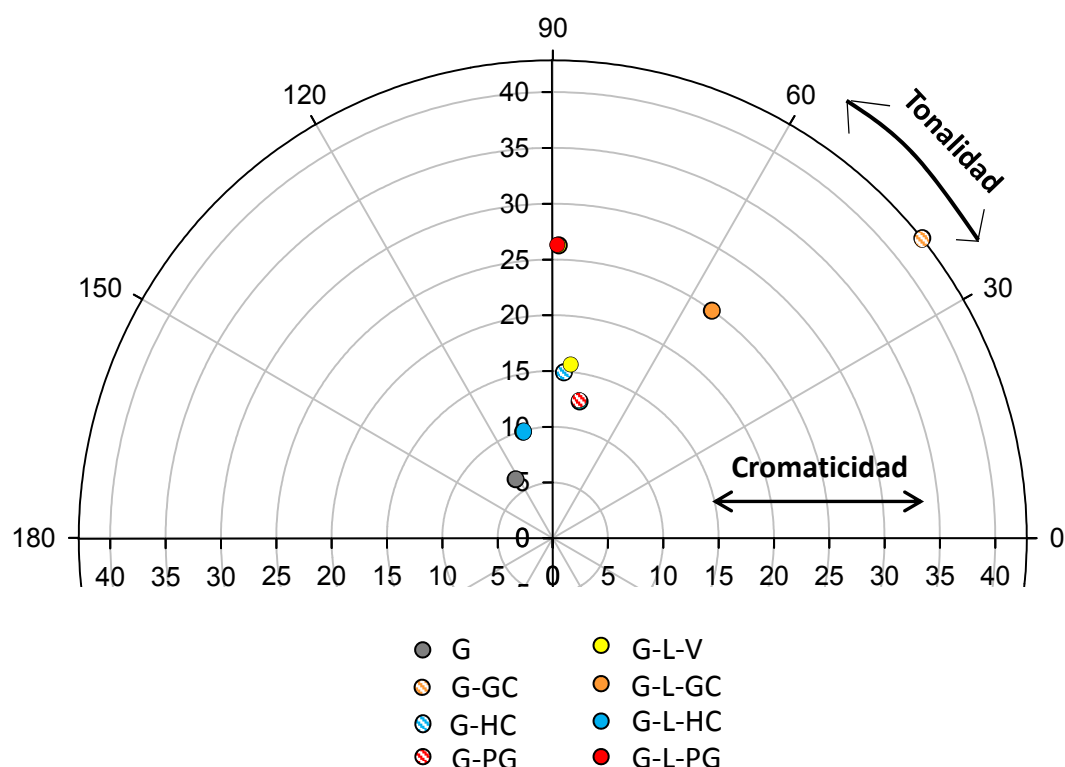


Figura 82. Gráfico reflejando los parámetros de color cromaticidad y tonalidad de geles de surimi formulados con extractos (G-HC, G-PG y G-GC) y formulados con extractos encapsulados en liposomas (G-L-V, G-L-HC, G-L-PG y G-L-GC), y un gel control sin liposomas (G).

Estos resultados fueron confirmados por el aspecto visual de dichos geles (Figura 83). El gel control (G) mostró un color blanco intenso ("A") correspondiente al color del surimi, mientras que los geles con liposomas presentaron tonalidades suaves del color de los extractos encapsulados, en algunos casos algo más intensas, como por ejemplo en G-L-PG ("D") y G-L-GC ("E"). El gel con los liposomas de hidrolizado de colágeno (G-L-HC) presentó un color amarillento ("C") atribuido más al color de la fosfatidilcolina (amarillo) que al del propio extracto (el cual era blanco). Esto se confirmó con el color del gel que contiene liposomas vacíos (G-L-V) que mostró un color amarillento ("B"), muy similar al de G-L-HC, que se corresponde con el color de la fosfatidilcolina. En cambio, el gel con hidrolizado de colágeno (G-HC) sí que mostró un color blanquecino atribuido únicamente al color del extracto ("F"). La ausencia de la cápsula permite que el gel adquiera un tono más intenso del color del extracto, como mostraron también los geles G-GC ("G") y G-PG ("H"), con intenso color naranja y marrón, respectivamente.

Los geles con bioactivos añadidos directamente mostraron un color mucho más intenso y llamativo, sin embargo, no presentaron una estructura y consistencia adecuada. Además, como se observa en la figura 83 (muestras "F", "G" y "H"), estos geles tuvieron importantes pérdidas de agua como consecuencia de la ausencia de la cápsula (liposomas) y la interacción directa del bioactivo con la matriz muscular. Esto pone de manifiesto que requerirían de un ingrediente ligante en la formulación de este sistema modelo para conferir una estructura adecuada, lo cual es habitual a nivel industrial. Por el contrario, los geles que contienen liposomas como ingrediente no parece que precisen de ingredientes adicionales para una formulación definitiva.

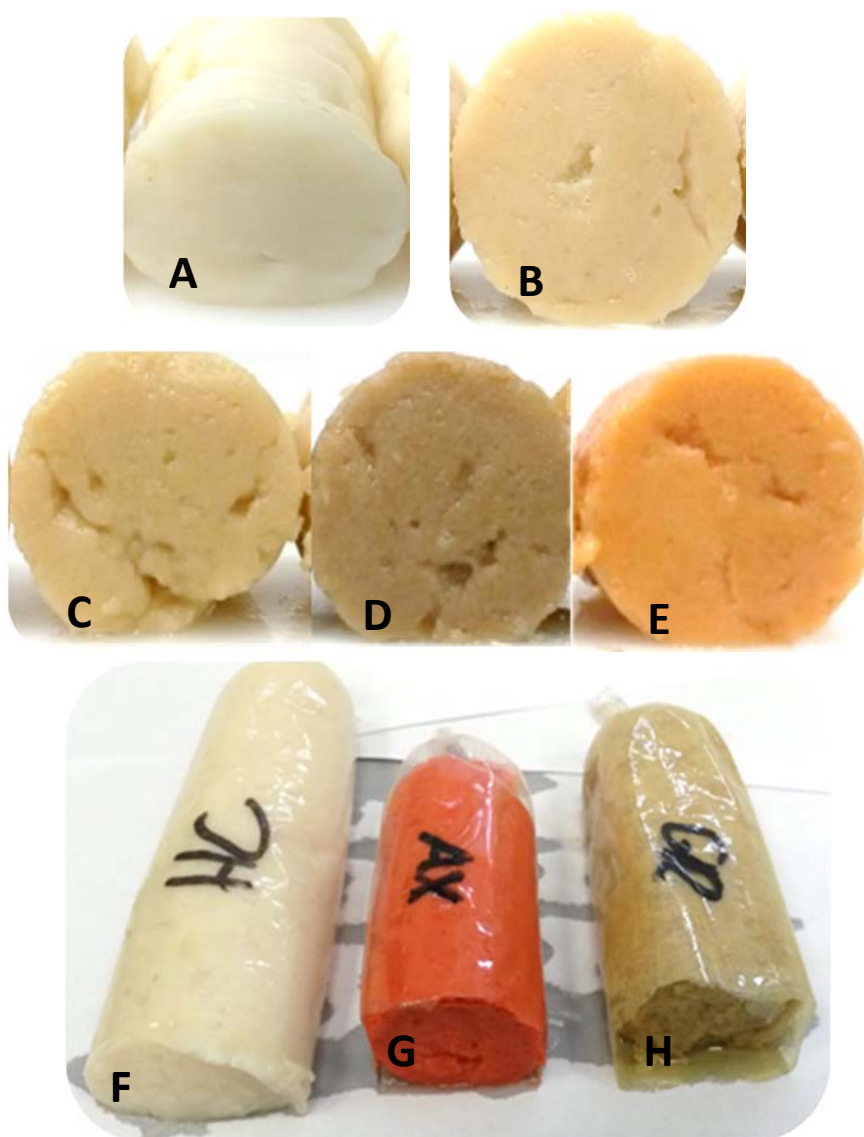


Figura 83. Fotografías de los diferentes geles de surimi. A: gel control sin liposomas (G); B: gel con liposomas vacíos (G-L-V); C: gel con liposomas de HC (G-L-HC); D: gel con liposomas de PG (G-L-PG); E: gel con liposomas de GC (G-L-GC); F: gel con extracto de HC (G-HC); G: gel con extracto de PG (G-PG); H: gel con extracto de GC (G-GC).

De hecho, la solubilidad proteica mostró valores muy bajos y similares ($p > 0,05$) para todos los geles que contenían liposomas (7,81-14,42 %), incluido el gel control (8,36 %) formulado sin liposomas, como cabía esperar, pues ya se ha formado el gel definitivo, y por tanto enlaces covalentes que implican una fuerte agregación proteica. Aun así queda alrededor de un 10 % de proteína soluble no agregada.

Los geles con liposomas se conservaron durante 7 meses a temperatura de congelación ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) y se estudiaron sus parámetros de color cromaticidad y tonalidad durante este tiempo (Tabla 35). Todos los geles mantuvieron constantes ambos parámetros durante todo el tiempo de conservación, manteniendo por tanto el mismo color durante 7 meses y reflejando una buena estabilidad en el tiempo.

Tabla 35. Parámetros de color cromaticidad y tonalidad de geles de surimi con liposomas (G-L-V, G-L-HC, G-L-PG, G-L-GC) y gel control sin liposomas (G), y su conservación hasta 7 meses a -20 °C. Diferentes letras (a, b, c, d, e) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre geles para un mismo tiempo de conservación y (m, n, o) en la misma fila entre diferentes tiempos de conservación para un mismo gel.

| | | 0 meses | 3 meses | 7 meses |
|---------------------|--------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Cromaticidad | G | $6,24 \pm 0,06^{a/m}$ | $5,67 \pm 0,06^{a/n}$ | $5,55 \pm 0,04^{a/o}$ |
| | G-L-V | $14,76 \pm 0,04^{c/m}$ | $14,83 \pm 0,03^{d/m}$ | $15,08 \pm 0,11^{d/n}$ |
| | G-L-HC | $14,89 \pm 0,05^{d/m}$ | $13,57 \pm 0,07^{c/n}$ | $13,62 \pm 0,11^{c/n}$ |
| | G-L-PG | $12,47 \pm 0,06^{b/m}$ | $11,10 \pm 0,21^{b/n}$ | $10,81 \pm 0,21^{b/o}$ |
| | G-L-GC | $24,94 \pm 0,15^{e/mn}$ | $24,87 \pm 0,12^{e/m}$ | $25,04 \pm 0,13^{e/n}$ |
| Tonalidad | G | $122,64 \pm 0,17^{e/m}$ | $132,12 \pm 0,49^{d/o}$ | $129,25 \pm 0,24^{d/n}$ |
| | G-L-V | $86,38 \pm 0,10^{d/m}$ | $86,14 \pm 0,06^{c/n}$ | $85,34 \pm 0,14^{c/o}$ |
| | G-L-HC | $86,08 \pm 0,07^{c/m}$ | $86,15 \pm 0,12^{c/m}$ | $85,25 \pm 0,14^{c/n}$ |
| | G-L-PG | $78,69 \pm 0,19^{b/m}$ | $78,58 \pm 0,30^{b/m}$ | $79,28 \pm 0,49^{b/n}$ |
| | G-L-GC | $54,76 \pm 0,05^{a/m}$ | $54,37 \pm 0,09^{a/o}$ | $54,57 \pm 0,03^{a/n}$ |

Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de fuerza de rotura (N), deformación (mm) y fuerza de gel (N x mm) de los geles formulados con liposomas se muestran en la tabla 36. El gel control (G) tuvo el mayor valor ($p \leq 0,05$) de fuerza de gel (8,98 N x mm) en comparación con cualquiera de los geles con liposomas (1,81-2,91 N x mm), atribuido a sus mayores valores tanto de fuerza de rotura (N) como de deformación del gel (mm). Estas diferencias se debieron a que los liposomas interfieren en las interacciones proteína-proteína de la matriz, disminuyendo la fuerza de gel y dando lugar a geles más débiles.

Los geles con liposomas G-L-HC y G-L-GC tuvieron valores similares ($p > 0,05$), a pesar de la diferente naturaleza de su extracto, y fueron superiores a G-L-V y G-L-PG, que mostraron los valores más bajos de fuerza de gel, atribuidos a sus menores valores de deformación y de fuerza de rotura. En particular, G-L-PG fue el de menor valor (1,81 N x mm) de fuerza de gel, lo que coincide con su mayor solubilidad proteica, obteniéndose un gel más débil. Esto indica que los liposomas que encapsulan el extracto de piel de granada inducen una mayor alteración en la red proteica del gel, probablemente debido a la gran cantidad de compuestos fenólicos no encapsulados.

Tras conservar los geles en congelación a -20 °C durante 7 meses (Tabla 36), el gel control (G) mostró un endurecimiento progresivo y acentuado hasta valores finales de fuerza de gel de 19,79 N x mm (y continuó siendo el que mostró más agregación y compactación), atribuido al aumento a 3 y 7 meses de conservación del parámetro de fuerza de rotura, sin apenas cambios en el de deformación. En cambio, los geles que contienen liposomas fueron más estables y previnieron en mayor medida la agregación proteica inducida por la conservación en congelación. Todos ellos experimentaron un leve incremento de su fuerza de gel a los 3 meses, debido a aumentos tanto de su fuerza de rotura como de la deformación de gel. Sin embargo, a partir de este momento los geles se mantuvieron estables manteniéndose los valores de fuerza de gel constantes durante el resto del periodo de conservación, excepto para G-L-GC que siguió aumentando hasta un valor final de 5,90 N x mm, atribuido al aumento de ambos parámetros. Entre ellos, el gel que contiene liposomas encapsulando el extracto de piel de granada (G-L-PG) fue el que más incrementó su fuerza de gel, probablemente debido a su mayor inestabilidad estructural inicial.

Tabla 36. Propiedades mecánicas de fuerza de rotura (N), deformación (mm) y fuerza de gel (N x mm) de geles de surimi formulados con liposomas (G-L-V, G-L-HC, G-L-PG, G-L-GC) y gel control sin liposomas (G), y su conservación hasta 7 meses a -20 °C. Diferentes letras (a, b, c, d, e) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre geles para un mismo tiempo de conservación y (m, n, o) en la misma fila entre diferentes tiempos de conservación para un mismo gel.

| | | 0 meses | 3 meses | 7 meses |
|-------------------------------|--------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| Fuerza de rotura (N) | G | $1,25 \pm 0,05^{c/m}$ | $1,71 \pm 0,13^{c/n}$ | $2,47 \pm 0,03^{e/o}$ |
| | G-L-V | $0,43 \pm 0,02^{b/m}$ | $0,62 \pm 0,06^{a/n}$ | $0,57 \pm 0,01^{a/n}$ |
| | G-L-HC | $0,41 \pm 0,01^{ab/m}$ | $0,76 \pm 0,04^{a/n}$ | $0,74 \pm 0,02^{b/n}$ |
| | G-L-PG | $0,35 \pm 0,03^{a/m}$ | $0,94 \pm 0,01^{b/n}$ | $1,02 \pm 0,01^{d/o}$ |
| | G-L-GC | $0,47 \pm 0,02^{b/m}$ | $0,57 \pm 0,08^{a/m}$ | $0,87 \pm 0,02^{c/n}$ |
| Deformación (mm) | G | $7,15 \pm 0,16^{d/m}$ | $6,98 \pm 0,04^{bc/m}$ | $8,00 \pm 0,00^{e/n}$ |
| | G-L-V | $4,33 \pm 0,06^{a/m}$ | $5,01 \pm 0,01^{a/n}$ | $5,32 \pm 0,13^{a/o}$ |
| | G-L-HC | $6,39 \pm 0,12^{cd/mn}$ | $6,91 \pm 0,39^{bc/n}$ | $6,01 \pm 0,07^{b/m}$ |
| | G-L-PG | $5,21 \pm 0,75^{b/m}$ | $7,76 \pm 0,12^{c/n}$ | $7,23 \pm 0,05^{d/n}$ |
| | G-L-GC | $6,13 \pm 0,06^{c/m}$ | $6,21 \pm 1,17^{ab/m}$ | $6,81 \pm 0,13^{c/m}$ |
| Fuerza de gel (N x mm) | Gel | $8,98 \pm 0,56^{c/m}$ | $11,94 \pm 0,95^{d/n}$ | $19,79 \pm 0,21^{e/o}$ |
| | G-L-V | $1,87 \pm 0,06^{a/m}$ | $3,11 \pm 0,30^{a/n}$ | $3,04 \pm 0,11^{a/n}$ |
| | G-L-HC | $2,63 \pm 0,02^{b/m}$ | $5,24 \pm 0,50^{b/o}$ | $4,45 \pm 0,10^{b/n}$ |
| | G-L-PG | $1,81 \pm 0,24^{a/m}$ | $7,29 \pm 0,17^{c/n}$ | $7,38 \pm 0,11^{d/n}$ |
| | G-L-GC | $2,91 \pm 0,16^{b/m}$ | $3,59 \pm 1,03^{a/m}$ | $5,90 \pm 0,18^{c/n}$ |

Efecto oxidativo

La estabilidad oxidativa de los geles con liposomas se determinó mediante el índice del ácido tiobarbitúrico (Tabla 37), que cuantifica el contenido de malonaldehído, un reconocido compuesto de oxidación secundaria responsable de la oxidación lipídica. La adición de liposomas al surimi incrementó el contenido de malonaldehído en los geles respecto al gel control (0,088 $\mu\text{g/kg}$ gel), siendo mayor para G-L-HC (0,511 $\mu\text{g/kg}$ gel) y menor para G-L-PG (0,276 $\mu\text{g/kg}$ gel), posiblemente debido a la excelente actividad antioxidante del extracto de piel de granada (PG), atribuida a su composición rica en compuestos fenólicos. Estos resultados indican que la adición de liposomas puede causar oxidación lipídica, que puede tener lugar durante el proceso de preparación de liposomas, ya que éstos sufren un calentamiento a 80 °C durante el procesado y posteriormente se someten a ultrasonificación, adicionalmente pueden sufrir también un tratamiento térmico extra (90 °C) durante el proceso de gelificación. Por tanto, estos geles que contienen liposomas pueden ser susceptibles de oxidación, dado que la composición de ácidos grasos de la fosfatidilcolina procedente de la lecitina de soja es altamente insaturada y por tanto susceptible de sufrir oxidación (Wang & Wang, 2008). Aun así, todos los valores de malonaldehído fueron muy bajos, indicando que el grado de oxidación fue leve. Todos los extractos bioactivos incorporados tienen una destacada actividad antioxidante, sin embargo, ésta no estuvo disponible para proteger al gel, lo que confirma su elevada eficacia de encapsulación en los liposomas. De hecho, L-PG fue el que tuvo una menor eficacia de encapsulación y como consecuencia G-L-PG tuvo un menor contenido de malonaldehído y menor oxidación lipídica.

Tras su conservación a -20 °C (Tabla 37), los geles fueron estables durante 3 meses, manteniendo inalterables sus valores ($p > 0,05$). Sin embargo, transcurridos 7 meses de conservación, los niveles de malonaldehído aumentaron notablemente ($p \leq 0,05$) en todos los geles, incluido el control, siendo mayores en aquellos que contienen liposomas. Esto significa que los bioactivos siguen estando eficientemente encapsulados y no disponibles de proteger al gel de la oxidación,

aunque ejerzan algo de efecto ya que el gel con liposomas sin extracto (G-L-V) mostró un mayor contenido de malonaldehído tras 7 meses. Aun así, los valores siguieron siendo bastante bajos en términos generales.

Tabla 37. Contenido acumulativo de malonaldehído, expresado en μg malonaldehído/kg gel, analizado mediante el método del índice tiobarbitúrico, en geles de surimi formulados con liposomas (G-L-V, G-L-HC, G-L-PG, G-L-GC) y gel control sin liposomas (G), y en su conservación hasta 7 meses a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Diferentes letras (a, b, c, d) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre geles para un mismo tiempo de conservación y (m, n, o) en la misma fila entre tiempos de conservación para un mismo gel.

| | 0 meses | 3 meses | 7 meses |
|--------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| G | $0,088 \pm 0,000^{a/m}$ | $0,015 \pm 0,000^{a/m}$ | $0,333 \pm 0,074^{a/n}$ |
| G-L-V | $0,286 \pm 0,074^{b/m}$ | $0,302 \pm 0,072^{bc/m}$ | $1,560 \pm 0,533^{c/n}$ |
| G-L-HC | $0,511 \pm 0,042^{d/m}$ | $0,508 \pm 0,059^{d/m}$ | $1,090 \pm 0,048^{bc/n}$ |
| G-L-PG | $0,276 \pm 0,027^{b/m}$ | $0,220 \pm 0,050^{b/m}$ | $0,763 \pm 0,085^{ab/n}$ |
| G-L-GC | $0,386 \pm 0,042^{c/m}$ | $0,380 \pm 0,072^{cd/m}$ | $0,848 \pm 0,052^{ab/n}$ |

Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los extractos bioactivos HC, PG y GC, libres y encapsulados en liposomas, cuantificada por el método del secuestro de radicales libres (ABTS) y expresada como mg de ácido ascórbico/gramo de muestra seca o de bioactivo se muestra en la figura 84. El extracto de hidrolizado de colágeno (HC) tuvo 22,36 mg ácido ascórbico/g muestra (Figura 84A), valor ligeramente inferior a los 35 mg ácido ascórbico/g muestra obtenidos por Alemán et al. (2011a) para gelatina de *Dosidicus gigas* hidrolizada con alcalasa. El extracto de piel de granada (PG) presentó un significativo ($p \leq 0,05$) mayor valor con 360,01 mg ácido ascórbico/g muestra, muy superior a los 0,99 mg ácido ascórbico/g muestra mostrados por Li et al., (2006) para un extracto similar, atribuida a su composición rica en compuestos fenólicos (Masci et al., 2016). La actividad antioxidante del extracto de grasa de crustáceo (GC) no pudo ser determinada debido a que es un extracto de carácter fuertemente hidrofóbico (no soluble en agua) y la técnica antioxidante emplea una fase acuosa. Sin embargo, el extracto de GC posee componentes como son el α -tocoferol y la astaxantina, compuestos conocidos por su elevada capacidad antioxidante (Gómez-Estaca et al., 2017).

Los extractos incorporados en liposomas mostraron menores valores de actividad antioxidante (Figura 84A) que sus respectivos extractos libres para HC y PG, siendo estas reducciones del 91 % para HC y del 98,5 % para PG. Estos resultados sugieren que ambos bioactivos están eficazmente encapsulados dentro de los liposomas. Aun así, ambos liposomas mostraron algo de actividad, incluso superior en L-PG a la de los liposomas vacíos (2,07 mg ácido ascórbico/g muestra). Dicha actividad podría atribuirse a los propios liposomas vacíos, a parte del extracto bioactivo que haya quedado adherido a la membrana externa de los liposomas, o bien a la parte de bioactivo no encapsulada. La mayor actividad en L-PG ($p \leq 0,05$) podría deberse bien a la mayor cantidad de extracto no encapsulado (36,8 %) o bien a su mayor poder antioxidante, en comparación con L-HC. El liposoma L-GC mostró una actividad de 1,1 mg ácido ascórbico/g muestra, atribuida en principio a los liposomas vacíos (2,07 mg ácido ascórbico/g muestra), dada la insolubilidad del extracto en agua. Sin embargo, no se puede descartar que dicha actividad proceda del extracto.

Analizando la actividad de los liposomas expresada por gramo de bioactivo (Figura 84B), los liposomas que encapsulan los tres tipos de bioactivos muestran una destacada actividad antioxidante. El liposoma L-HC presentó un valor de 52,33 mg ácido ascórbico/g bioactivo, valor superior al mostrado por el extracto. Estos valores superiores de actividad no se atribuyen a la

cápsula, ya que la vesícula vacía mostró valores de 2,07 mg ácido ascórbico/g bioactivo, sino a una posible mejora de la conformación peptídica para el secuestro de radicales libres en la superficie de membrana, donde se encuentra parte de este bioactivo, o al resto de componentes que conforman el bioactivo. La actividad del liposoma L-PG mostró una disminución (146,63 mg ácido ascórbico/g bioactivo) con respecto a la de su respectivo extracto, probablemente debido a una degradación parcial de sus compuestos fenólicos durante el proceso de preparación de los liposomas o por una menor disponibilidad de los sitios reactivos como consecuencia de la interacción de los fenoles con la bicapa lipídica (Lopes de Azambuja et al., 2015). Aun así, los liposomas de PG siguieron siendo los de mayor actividad antioxidante ($p \leq 0,05$). Por el contrario, los liposomas de GC presentaron una actividad de 28,54 mg ácido ascórbico/g bioactivo, muy superior a la observada en las dos formulaciones anteriores, demostrando que este extracto tiene un importante poder antioxidante enmascarado por la insolubilización de su extracto. Estos resultados sugieren que los extractos son muy antioxidantes pero su potencial bioactivo está eficientemente protegido por los liposomas, evitando su degradación.

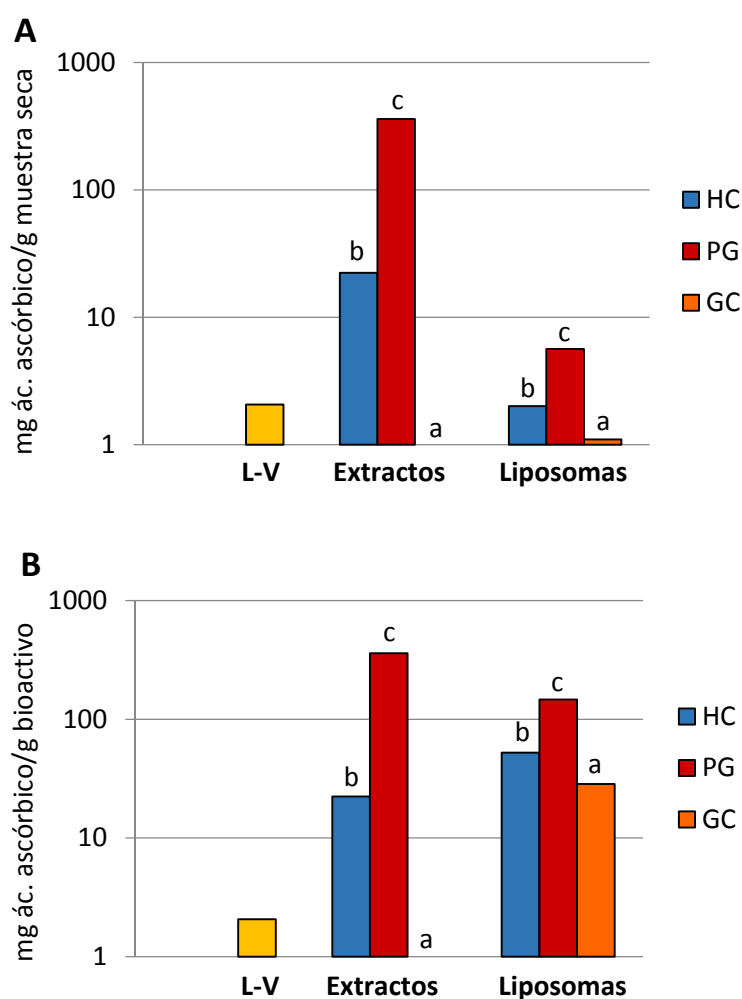


Figura 84. Actividad antioxidante como secuestro de radicales libres (ABTS) de los extractos bioactivos HC, PG y GC libres y encapsulados en liposomas, expresada como A) mg ácido ascórbico por gramo de muestra seca y B) mg ácido ascórbico por gramo de bioactivo. Un control de liposomas sin extracto se estudió en paralelo (barra amarilla). Diferentes letras (a, b, c) indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre diferentes bioactivos dentro de una misma formulación.

La figura 85 muestra la actividad antioxidante (capacidad reductora) de los extractos libres y encapsulados expresada como μmol de equivalentes Fe^{2+} /g muestra seca y como μmol de

equivalentes Fe^{2+} /g bioactivo determinado mediante el poder reductor del hierro (FRAP). Se observaron (Figura 85A) los mismos resultados que para el método de secuestro de radicales libres, con alguna excepción. El extracto HC mostró 7,11 $\mu\text{mol eq Fe}^{2+}$ /g muestra, valor inferior a los 16-17 $\mu\text{mol eq Fe}^{2+}$ /g muestra obtenidos por Giménez et al. (2009). El extracto de PG (4622,59 $\mu\text{mol eq Fe}^{2+}$ /g muestra) tuvo la mayor actividad ($p \leq 0,05$). El extracto de GC no pudo ser determinado debido a su baja solubilidad en agua.

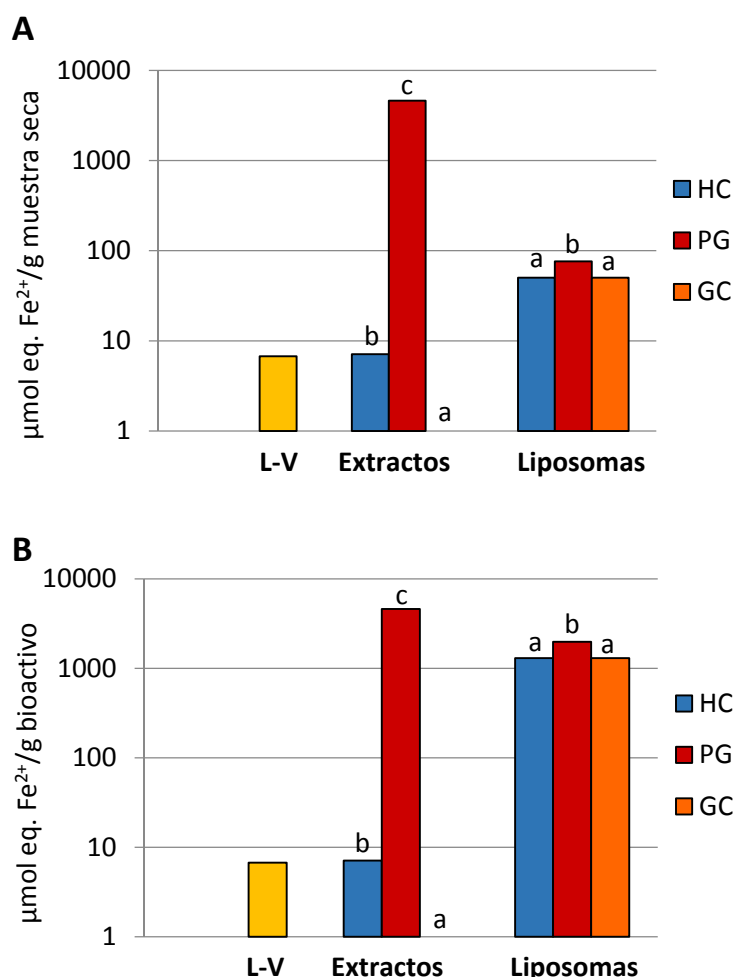


Figura 85. Actividad antioxidante determinada como poder reductor del hierro (FRAP) de los extractos bioactivos HC, PG y GC libres y encapsulados en liposomas, expresada como A) $\mu\text{mol eq. Fe}^{2+}$ por gramo de muestra seca y B) $\mu\text{mol eq. Fe}^{2+}$ por gramo de bioactivo. Un control de liposomas sin extracto se estudió en paralelo (barra amarilla). Diferentes letras (a, b, c) indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre diferentes bioactivos dentro de una misma formulación.

Cuando los extractos se encapsularon en liposomas, la actividad determinada fue menor para L-PG (76,24 $\mu\text{mol eq Fe}^{2+}$ /g muestra, reducción del 98,4 %), demostrando la eficaz encapsulación del bioactivo, y mayor para L-GC (50,09 $\mu\text{mol eq Fe}^{2+}$ /g muestra), demostrando el poder antioxidante del extracto de GC. En ambos casos la actividad se atribuye al bioactivo, dado que los liposomas vacíos únicamente mostraron 6,75 $\mu\text{mol eq Fe}^{2+}$ /g muestra. Los anillos terminales de la astaxantina se localizan preferentemente en la superficie de membrana de los liposomas y en la interfaz de la membrana, estando disponibles para el secuestro de radicales libres (Hama et al., 2012), lo que sugiere que la estructura de liposomas mejora la disponibilidad del extracto lipofílico.

La excepción fue L-HC, cuyo valor (50,09 $\mu\text{mol eq Fe}^{2+}/\text{g muestra}$) fue mucho mayor que el del extracto. Esta mayor actividad, no atribuida a la baja actividad de los liposomas vacíos (6,75 $\mu\text{mol eq Fe}^{2+}/\text{g muestra}$), podría deberse a una reacción de Maillard o glicosilación no enzimática. Esta reacción, típica en alimentos ricos en proteínas y péptidos (HC es un hidrolizado peptídico), tiene lugar entre un azúcar reductor y un grupo amino libre, dando lugar a la formación de unos compuestos llamados melanoidinas (Olmos et al., 2009), los cuales podrían aportar la actividad antioxidante excedente en la determinación de L-HC (Miranda et al., 2007).

Analizándolos por gramo de bioactivo (Figura 85B), tiene un comportamiento semejante, si bien los valores aumentan. La capacidad antioxidante aumenta en L-HC hasta los 1302,23 $\mu\text{mol eq Fe}^{2+}/\text{g bioactivo}$ y en L-GC hasta los 1302,34 $\mu\text{mol eq Fe}^{2+}/\text{g bioactivo}$, disminuyendo en L-PG hasta los 1982,34 $\mu\text{mol eq Fe}^{2+}/\text{g bioactivo}$, debido a la posible degradación parcial del extracto. Estos resultados confirman la excelente actividad antioxidante de los extractos (mayor en PG) y su eficaz encapsulación en liposomas.

La figura 86 muestra la actividad antioxidante determinada mediante el contenido de sustancias reactivas al Folin-Ciocalteu expresada como mg ácido gálico por gramo de muestra seca y de bioactivo de extractos libres y encapsulados, con similar comportamiento que en las actividades antioxidantes vistas anteriormente.

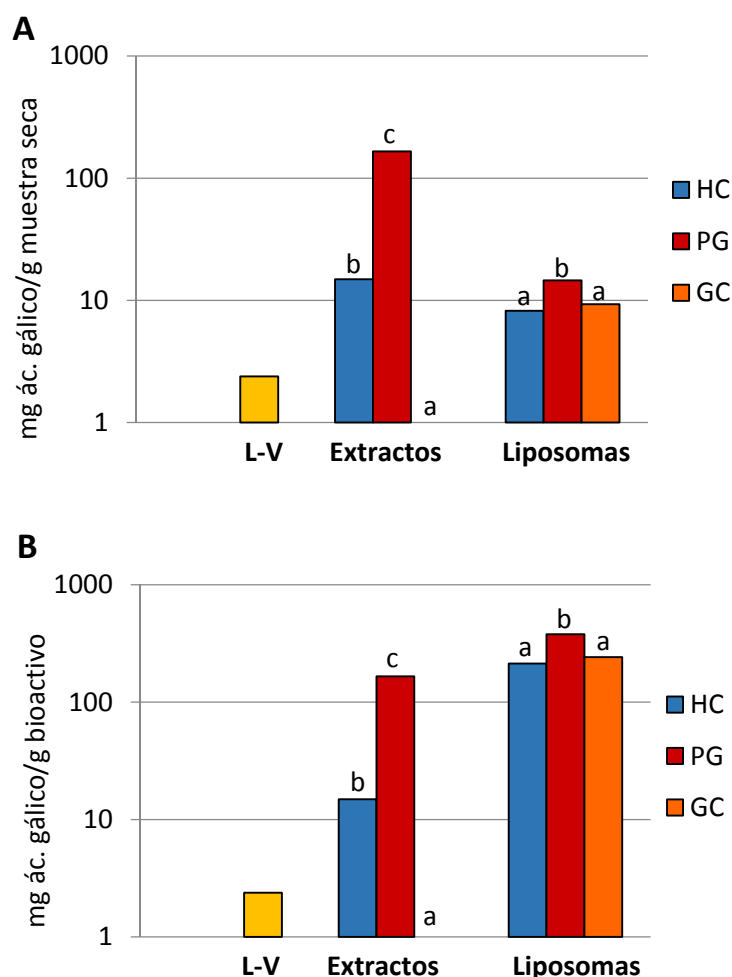


Figura 86. Actividad antioxidante como contenido de sustancias reactivas al Folin-Ciocalteu de los extractos bioactivos HC, PG y GC libres y encapsulados en liposomas, expresada como A) mg ácido gálico por gramo de muestra seca y B) mg ácido gálico por gramo de bioactivo. Un control de liposomas sin extracto se estudió en paralelo (barra amarilla). Diferentes letras (a, b, c) indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre diferentes bioactivos dentro de una misma formulación.

Los valores de los extractos fueron (Figura 86A) 14,89 mg ácido gálico/g muestra para HC y 166,0 mg ácido gálico/g muestra para PG ($p \leq 0,05$), sin determinación para GC. Estos valores disminuyeron para los correspondientes bioactivos encapsulados, un 45 % para L-HC y un 91,2 % para L-PG, mientras que los liposomas que contienen GC mostraron actividad (9,29 mg ácido gálico/g muestra).

Cuando se expresa la actividad por bioactivo seco (Figura 86B), al igual que en las actividades antioxidantes anteriores, el comportamiento es similar, pero los valores muy superiores a cuando se expresa por gramo de muestra. Así, las actividades aumentaron hasta 213,38 mg ácido gálico/g bioactivo para L-HC y hasta 241,48 mg ácido gálico/g bioactivo para L-GC. En este caso también aumentó para L-PG (379,02 mg ácido gálico/g bioactivo), posiblemente debido a otros componentes adicionales a los compuestos fenólicos que reaccionan con el reactivo de la técnica (Folin-Ciocalteu), dada la baja actividad de los liposomas vacíos (2,38 mg ácido gálico/g bioactivo). Estos resultados confirman las conclusiones anteriores.

La actividad antioxidante, determinada por fotoquimioluminiscencia para el material lipofílico, mostró (Figura 87) valores muy diferentes tanto en los extractos como en los liposomas, y como en casos anteriores, los valores con liposomas muy inferiores para la mayoría de los casos. En el hidrolizado de colágeno, debido a su naturaleza hidrofílica (solo el 28 % es de naturaleza hidrofóbica), los valores fueron notablemente inferiores al resto (0,378 mg eq Trolox/g muestra), mientras que para el extracto de piel y albedo de granada mostró valores muy elevados (644541,275 mg eq Trolox/g muestra) y para el extracto de grasa de crustáceo los valores fueron intermedios (60,892 mg eq Trolox/g muestra). Estos resultados indican que PG fue el extracto con mayor poder antioxidante, constituido por una importante proporción de compuestos fenólicos lipofílicos, que deben estar embebidos en la membrana lipídica. En los correspondientes extractos encapsulados en liposomas la actividad disminuyó notablemente para L-PG y L-GC, confirmando la buena eficacia de encapsulación, dado que la actividad de los liposomas vacíos fue de 0,02 mg eq Trolox/g muestra. En cambio, la actividad de L-HC (0,326 mg eq Trolox/g muestra) fue similar a la de su extracto; dado que esta actividad se determina en medio lipofílico, refleja la actividad de los componentes hidrofóbicos del hidrolizado, que son una parte minoritaria.

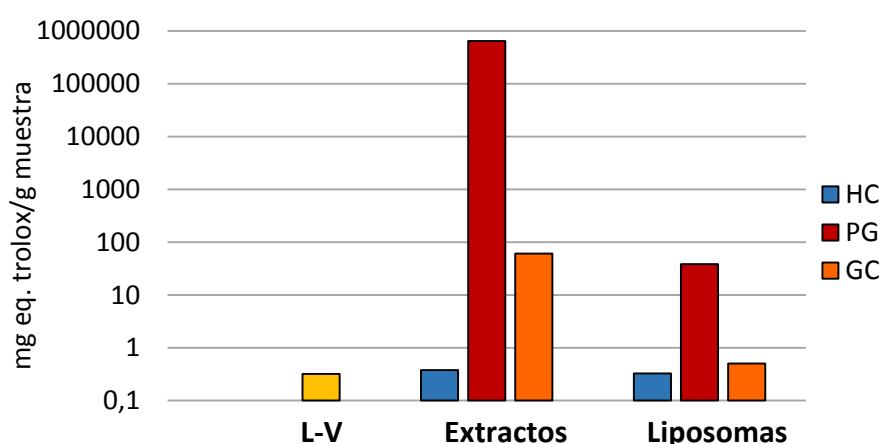


Figura 87. Actividad antioxidante por el método de fotoquimioluminiscencia (en fase lipofílica) de los extractos bioactivos HC, PG y GC libres y encapsulados en liposomas, expresada como mg equivalentes de trolox por gramo de muestra. Un control de liposomas sin extracto se estudió en paralelo (barra amarilla).

Con el fin de obtener una idea de la bioaccesibilidad potencial, los geles de surimi que incorporan los extractos encapsulados en liposomas se sometieron a digestión gastrointestinal simulada. La capacidad de secuestro de radicales residual (método ABTS) se determinó en las digestiones,

expresadas por g de muestra en base a peso seco y en base a cantidad de bioactivo (Figura 88). Con fines comparativos, también se analizaron geles con extractos añadidos libres (no encapsulados), aunque, como se discutió anteriormente, no mostraron propiedades de gel adecuadas.

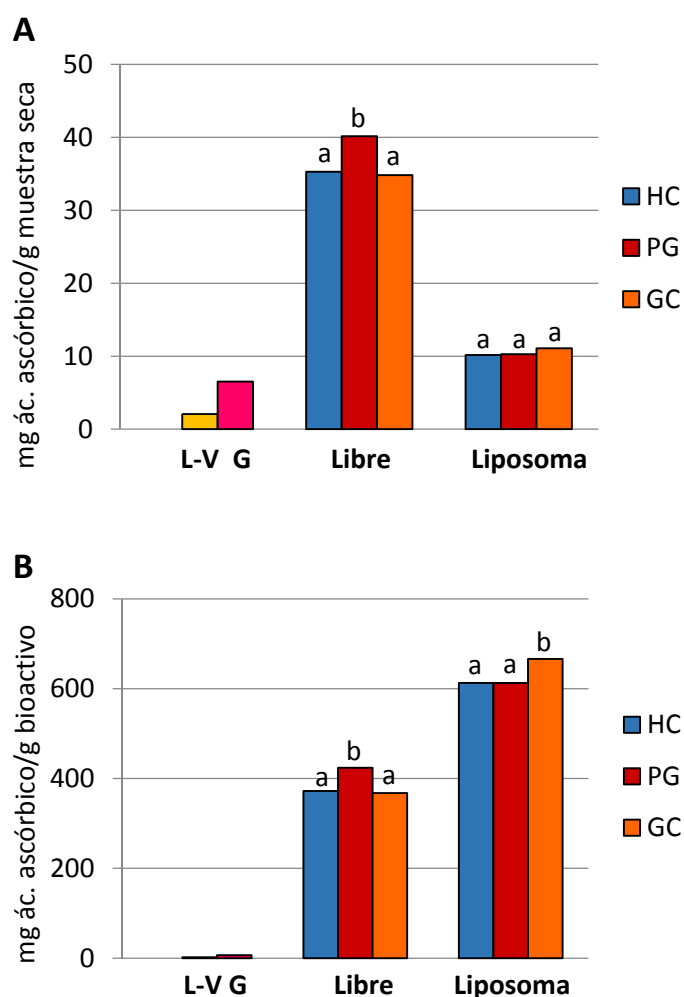


Figura 88. Actividad antioxidante como secuestro de radicales libres (ABTS) de geles de surimi digeridos con los extractos bioactivos HC, PG y GC incorporados directamente (Libre) y en liposomas (liposomas), expresada como A) mg ácido ascórbico por gramo de muestra seca y B) mg ácido ascórbico por gramo de bioactivo. Un control de liposomas (barra amarilla) y un control de surimi (barra rosa) se estudiaron en paralelo. Diferentes letras (a, b) indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre diferentes bioactivos dentro de una misma formulación.

La capacidad de secuestro de radicales de los digeridos fue menor cuando los extractos bioactivos se añadieron encapsulados en liposomas en comparación con la forma libre. El valor de ABTS del digerido del gel de surimi sin extracto fue de $6,53 \pm 0,09$ mg /g muestra, que fue notablemente menor que con los liposomas añadidos (alrededor de 14,5 mg muestra/g muestra). La actividad antioxidante encontrada en los geles de surimi después de la digestión gastrointestinal *in vitro* se relacionó con la liberación de péptidos cortos de la miosina polimerizada térmicamente en el gel (Ueki et al., 2014). Los valores de ABTS aumentaron cuando se incorporaron los diferentes extractos, especialmente en el modo libre, aunque hubo ligeras diferencias dependiendo del tipo de extracto ($p \leq 0,05$). Una posible explicación para la obtención de resultados similares en el secuestro de radicales de los diferentes digeridos de geles con los distintos liposomas encapsulando bioactivos, es que la actividad de los bioactivos es muy inferior

a la que pueda aportar el músculo tras la digestión. La digestión de proteínas podría haber sido favorecida en las matrices de gel más pobres y más débiles, resultantes de la distorsión de las interacciones proteína-proteína por la presencia de extractos bioactivos o liposomas. El efecto fue más evidente con los extractos añadidos en forma libre, que produjeron geles inadecuados. Los valores más bajos de ABTS encontrados en todos los geles que contienen liposomas serían también el resultado del efecto de dilución producido por el contenido de liposomas (10,5 %) en la proteína miofibrilar digerida.

También debería tenerse en cuenta que la actividad de los diversos extractos, además, podría haber sido modificada como resultado de la digestión. A este respecto, se encontró un aumento en la actividad de secuestro de radicales del hidrolizado de colágeno después de someter a éste (HC) a la digestión, aumentando los valores de ABTS de 22,36 a 33,17 mg ácido ascórbico/g de extracto seco. Resultados similares fueron obtenidos por Alemán et al. (2013) para fracciones de péptidos digeridos a partir de hidrolizado de calamar. Este efecto podría contribuir, aunque levemente, a aumentar los valores de ABTS en los correspondientes geles de surimi digeridos. Por el contrario, la actividad de PG después de digerirlo disminuyó significativamente ($p \leq 0,05$) de 360,01 a 188,30 mg ácido ascórbico/g de extracto seco, lo que indica una notable inactivación de compuestos fenólicos después de la digestión (Surek & Nilufer-Erdil, 2016). Esta podría ser una razón por la cual, a pesar de que tenía mucha más actividad, la diferencia resultante en el gel que tiene incorporado extracto de piel de granada (PG) era pequeña en comparación con los geles que contienen los otros dos extractos, HC y GC.

En cuanto a los geles que contienen liposomas, no se encontraron diferencias significativas en la actividad antioxidante mostrada entre las formulaciones que contienen liposomas encapsulando HC y encapsulando PG, y mostrando una actividad ligeramente mayor para los geles que contienen liposomas con GC ($p \leq 0,05$), si bien las diferencias son muy pequeñas. En todos los casos la actividad cuando se expresa por g de muestra fue muy inferior en comparación a la de los geles que contenían el extracto directamente en forma libre. Esto se debe a la mayor concentración de extracto que tienen los geles que contienen los extractos en forma libre (2 % de extracto) con respecto a los geles que contienen los extractos encapsulados en liposomas (0,4 % extracto), dado que como se puede apreciar en la figura 88B, en las muestras digeridas y expresadas por cantidad de extracto son mucho más antioxidantes aquellas que estaban inicialmente encapsuladas y mantienen su biodisponibilidad después de la digestión. Otro factor que apoya estos resultados es el que en los geles formulados con los bioactivos incorporados en liposomas, los extractos estarían eficientemente encapsulados en los mismos, reflejando así una menor actividad que en los geles formulados con los bioactivos incorporados directamente, en los que la ausencia de la cápsula favorece la cuantificación de la actividad correspondiente a los extractos bioactivos. Por tanto, los geles que contienen extractos encapsulados en liposomas son una buena estrategia tecnológica con excelentes propiedades estructurales y mecánicas que mejoran la bioaccesibilidad de los extractos bioactivos.

La actividad antioxidante de los geles de surimi digeridos con y sin liposomas mediante la capacidad de reducción del hierro (FRAP) se muestra en la figura 89. Los resultados obtenidos mostraron un comportamiento diferente a los observados en el secuestro de radicales libres. Lo más destacable es la elevada actividad que manifiestan los geles que contienen extracto de piel de granada, ya sea añadido en forma libre o en forma encapsulada en liposomas ($p \leq 0,05$), en comparación al resto, que hace que sea inapreciable/despreciable el resto de actividades. De hecho, los valores para estas dos últimas formulaciones (geles con extractos de HC y GC, tanto libres como encapsulados en liposomas) son semejantes ($p \leq 0,05$) a los obtenidos en el digerido del gel sin adición de extractos ni liposomas ($2,58 \pm 0,04 \mu\text{g equivalentes Fe}^{2+}/\text{g muestra}$), y en el que contenía liposomas vacíos ($6,75 \mu\text{g equivalentes Fe}^{2+}/\text{g muestra}$). Al igual que en la actividad anterior, se pone en evidencia el efecto de dilución, apreciando, cuando se expresa por cantidad de extracto (Figura 89B), cómo tras la digestión los geles con extractos

encapsulados en liposomas manifiestan una actividad considerablemente más elevada ($p \leq 0,05$) que cuando se digieren los geles con extractos adicionados de forma libre.

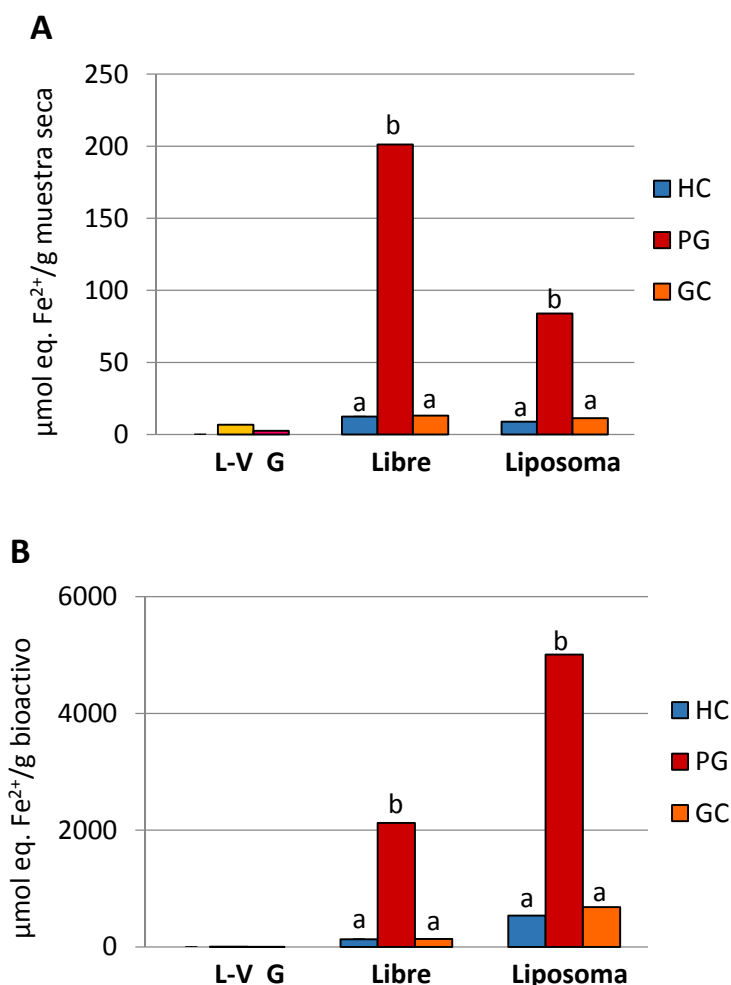


Figura 89. Actividad antioxidante determinada como poder reductor del hierro (FRAP) de geles de surimi digeridos con los extractos bioactivos HC, PG y GC incorporados directamente (Libre) y en liposomas (liposomas), expresada como A) μg equivalentes Fe^{2+} por gramo de muestra seca y B) μg equivalentes Fe^{2+} por gramo de bioactivo. Un control de liposomas (barra amarilla) y un control de surimi (barra rosa) se estudiaron en paralelo. Diferentes letras (a, b) indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre diferentes bioactivos dentro de una misma formulación.

La actividad antioxidante como contenido en sustancias reactivas al Folin (Figura 90) tras la digestión gastrointestinal *in vitro* de los geles muestra un comportamiento bastante similar al observado en el secuestro de radicales libres, aunque hubo excepciones, ya que mientras que la presencia de piel de granada en forma libre en los geles manifestaba con diferencia la mayor actividad ($p \leq 0,05$), cuando se adicionada encapsulada en liposomas, los digeridos de éstos geles mostraban los menores valores ($p \leq 0,05$), aunque en este caso los valores se encontraban dentro del mismo rango que el resto de formulaciones.

La determinación de las sustancias reactivas al Folin es un método ampliamente utilizado para la determinación de fenoles, pero no son los únicos compuestos con los que pueden reaccionar, hay otros como azúcares y aminoácidos que también son reactivos al Folin. Por ello, los geles de surimi que contienen tanto HC como GC (ya sea en forma libre o encapsulada), que tienen en su composición aminoácidos y péptidos en mayor o menor grado, pueden mostrar actividad en

esta técnica. Otra explicación para la falta aparente de actividad en los geles con liposomas de granada sería que parte del extracto de piel de granada no encapsulado haya sido digerido y parcialmente degradado. En este sentido, la digestión gastrointestinal simulada del extracto provocó una disminución de su capacidad reductora desde 4622,59 hasta 2323,33 μg equivalentes Fe^{2+}/g extracto. Este hallazgo coincide con los resultados de Surek & Nilufer-Erdil (2016) para un extracto de piel de granada, los cuales observaron una notable inactivación de compuestos fenólicos después de ser digeridos.

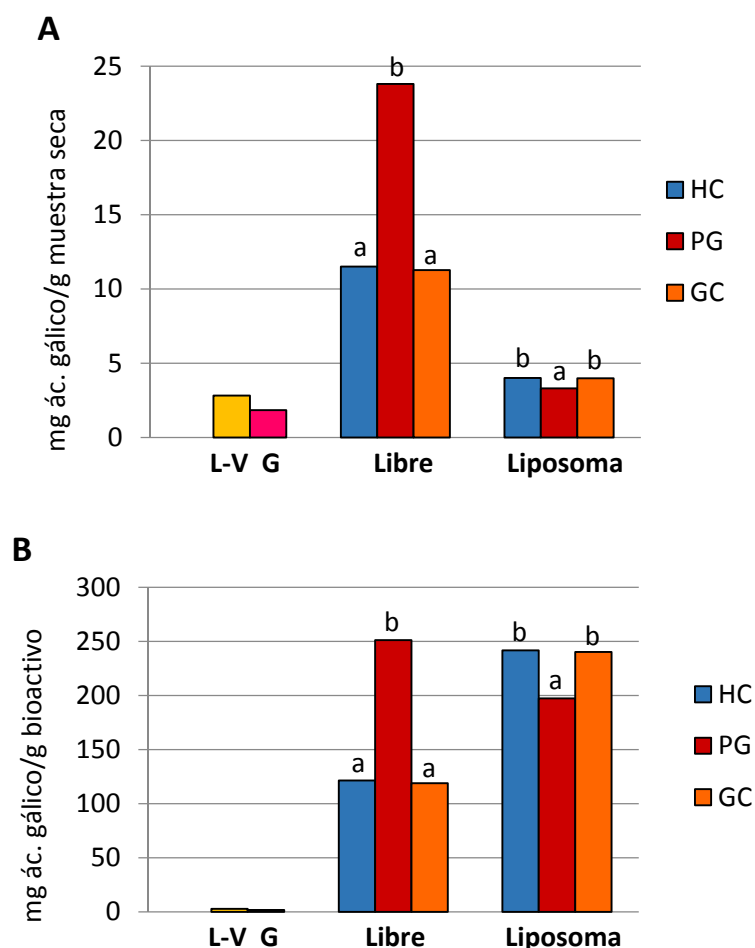


Figura 90. Actividad antioxidante como contenido en sustancias reactivas al Folin-Ciocalteu de geles de surimi digeridos con los extractos bioactivos HC, PG y GC incorporados directamente (Libre) y en liposomas (liposomas), expresada como A) mg ácido gálico (AG) por gramo de muestra seca y B) mg ácido gálico (AG) por gramo de bioactivo. Un control de liposomas (barra amarilla) y un control de surimi se estudiaron en paralelo. Diferentes letras (a, b) indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre diferentes bioactivos dentro de una misma formulación.

Conclusiones

Los tres extractos procedentes de diferentes fuentes naturales, que constituyen un residuo en la industria alimentaria, se encapsularon eficientemente en liposomas de fosfatidilcolina de soja con una elevada estabilidad de partícula. Aunque la liofilización incrementa el tamaño medio y el índice de polidispersidad de los liposomas rehidratados, un importante porcentaje de vesículas mantienen su tamaño en el rango de nanoescala. La liofilización representa una solución factible para ajustar el contenido final de agua en los geles de surimi. La incorporación de liposomas liofilizados proporcionó integridad al gel y mantuvo su estabilidad durante su

conservación en congelación a largo plazo. Los geles de surimi sometidos a digestión mostraron una destacada capacidad antioxidante atribuida principalmente a la proteína miofibrilar digerida. Los extractos encapsulados no fueron capaces de proteger a la matriz de la oxidación lipídica completamente, que en cualquier caso fue muy baja. Por tanto, se podría decir que los extractos están eficientemente encapsulados y protegidos de su degradación o interacción directa con la matriz por la membrana de los liposomas. Sin embargo, ensayos *in vivo* serían necesarios para comprobar la biodisponibilidad de los extractos bioactivos encapsulados e incorporados en geles de surimi.

CAPÍTULO 4. APLICACIÓN DE LIPOSOMAS EN PELÍCULAS COMESTIBLES

8.8. CAMBIOS EN LA INTEGRIDAD ESTRUCTURAL DE PELÍCULAS DE CASEINATO DE SODIO MEDIANTE LA ADICIÓN DE NANOLIPOSOMAS ENCAPSULANDO UNA FRACCIÓN PEPTÍDICA ACTIVA DE LANGOSTINO (*PENAEUS NOTIALIS*)

Resumen

Langostinos (*Penaeus notialis*) sin valor comercial (congelados durante 6 meses) se sometieron a hidrólisis enzimática con tripsina y se aisló la fracción peptídica de peso molecular <1 kDa (FP1). La fracción peptídica liofilizada presentó actividad biológica: capacidad de secuestro de radicales libres (método ABTS: 69,13 mg ácido ascórbico/gramo muestra), capacidad antihipertensiva (inhibición de la enzima convertidora de angiotensina, $IC_{50} = 74 \mu\text{g/mL}$) y capacidad hipoglucémica (inhibición de la enzima dipeptidil peptidasa IV, $IC_{50} = 0,46 \text{ mg/mL}$). Se elaboraron liposomas de fosfatidilcolina de soja parcialmente purificada, conteniendo la fracción peptídica FP1 (5 mg/mL en buffer fosfato, pH 7), en presencia de 5 % de glicerol (L-FP1), este último para preservar la bicapa durante el proceso de deshidratación en la formación de la película. Se prepararon liposomas vacíos sin el péptido en condiciones similares (L-V) con el propósito de comparar. La fracción peptídica fue encapsulada con una eficacia del 52,37 %. El tamaño medio de L-FP1 y de L-V fue de 99,98 nm y de 87,40 nm, y el potencial zeta fue de -53,87 mV y de -35,53 mV, respectivamente. Las suspensiones de liposomas vacíos y de liposomas encapsulando la fracción peptídica se incorporaron en películas comestibles de caseinato sódico, dando lugar a matrices de distribución uniforme y estructura vesicular bien preservada. Las películas con liposomas fueron más solubles en agua, sin cambios en el espesor o la transparencia. Los liposomas intensificaron el efecto de adhesividad y de mucoadhesión, especialmente las películas con el péptido. La evaluación sensorial mostró una percepción del sabor muy favorable, independientemente de la presencia y tipo de liposomas añadidos. Se observaron diferencias en el tiempo de disolución oral en boca, siendo más rápida en películas formuladas con liposomas como resultado de la discontinuidad de la matriz. La película podría usarse en diferentes diseños de alimentos sin distorsionar la aceptación sensorial del producto final.

Palabras clave: fracción peptídica de músculo de langostino, liposomas, películas comestibles, mucoadhesión, integridad estructural, propiedades sensoriales.

Introducción

En el sector de la alimentación existe una demanda creciente de productos de origen natural, con capacidad bioactiva, baja toxicidad y que no desencadenen problemas medioambientales. Para la elaboración de estos productos puede emplearse una amplia variedad de moléculas activas como ingrediente. Gran parte de estas moléculas podrían derivar de residuos o de subproductos de la industria alimentaria. La valorización de estas materias resultaría en un doble beneficio, económico y medioambiental, a la vez que obtenemos productos de alto valor añadido o co-productos (López-Caballero et al., 2013).

La obtención de hidrolizados proteicos a partir de residuos de la industria pesquera ha recibido una considerable atención en la última década (López-Caballero et al., 2013). Estos hidrolizados son una importante fuente de péptidos bioactivos con diversas propiedades tales como antioxidante, antihipertensiva o hipoglucémica (López-Caballero et al., 2013; Ketnawa et al., 2016; Ji et al., 2017). Estos péptidos bioactivos podrían emplearse como ingredientes potenciales en alimentos funcionales. Sin embargo, durante el almacenamiento y/o procesamiento de alimentos, los péptidos pueden estar sujetos a degradación proteolítica, mostrar inestabilidad en condiciones extremas (pH, temperatura, oxígeno...) y/o interactuar con otros componentes (cationes divalentes, lípidos, proteínas...) (Aasen et al., 2003; Chollet et al., 2008; Mozafari et al., 2008). Todos estos factores limitan sus beneficios potenciales y hacen

necesaria la búsqueda de mecanismos protectores para mantener a los péptidos activos hasta su consumo o incluso su liberación en los sitios activos.

Los liposomas son ampliamente estudiados por ser un buen mecanismo de encapsulación para proteger y transportar los péptidos bioactivos (Da Silva Malheiros et al., 2010). Además, el uso de películas como vehículos de liposomas encapsulando péptidos podría representar una estrategia versátil para introducirlos en un alimento funcional, sin necesidad de reestructurar o afectar en gran medida a la presentación del alimento. Al mismo tiempo, podrían evitarse los efectos no deseables derivados de las interacciones excesivas de los péptidos bioactivos con otros componentes de la matriz, o el sabor fuerte que pudieran producir.

Merece la pena destacar que la película podría considerarse por sí misma un sistema modelo de alimento con bajo contenido en agua. Sin embargo, los péptidos libres o encapsulados en liposomas podrían inducir cambios físicos en la estructura de la película que deberían tenerse en cuenta. Giménez et al. (2009) observaron que la incorporación de hidrolizados peptídicos indujo un efecto plastificante en películas de gelatina. También se observó que la adición de liposomas podría modificar la estructura molecular de las películas de quitosano, dando lugar a una disminución de la densidad y de la fuerza a la tracción, junto con un aumento simultáneo de la solubilidad en agua (Cui et al., 2017). Por otro lado, se ha descrito que las películas de caseinato son excelentes matrices para incorporar nisina encapsulada en liposomas sin alterar la resistencia mecánica y las propiedades térmicas de estas películas (Boelter & Brandelli, 2016).

El empleo de películas comestibles mucoadhesivas transportando liposomas con péptidos bioactivos encapsulados (ya sea como una tira comestible de rápida disolución o como films para envolver alimentos) podría ser un modo interesante para la liberación de estas moléculas activas en boca. Las mucosas bucal y sublingual son altamente permeables y permiten que nanocápsulas conteniendo bioactivos pasen directamente al sistema circulatorio y penetren en los tejidos a través de finos capilares (Patel et al., 2011). Investigaciones recientes indican que estos sistemas mucoadhesivos deben proporcionar una liberación rápida en la cavidad oral (Silva et al., 2015; Mašek et al., 2017). Independientemente del modo de presentación, la respuesta en boca de las películas mucoadhesivas requiere una rápida disolución, evitando la impresión de ingerir un plástico artificial.

Objetivos

El objetivo de este experimento fue la preparación de una película funcional de caseinato sódico con propiedades mucoadhesivas y buenas propiedades sensoriales mediante la incorporación de nanoliposomas conteniendo una fracción peptídica obtenida a partir de descartes de langostinos con actividad biológica, la cual se caracterizó en términos de peso molecular, composición de aminoácidos y actividad biológica *in vitro* (capacidades antioxidante, antihipertensiva e hipoglucémica).

Materiales y métodos

Se utilizó fosfatidilcolina parcialmente purificada de cinco lavados (FC5) a partir de lecitina de soja (LS). También se llevó a cabo la extracción de una fracción peptídica (FP1) procedente de langostino (*Penaeus notialis*) sin valor comercial. Brevemente, una vez inactivadas las enzimas endógenas por calor, los langostinos enteros se trataron con tripsina (38 °C, pH 8, 90 min). Posteriormente se inactivó la enzima y el hidrolizado se pasó a través de un sistema de ultrafiltración tangencial con un filtro de 1 kDa (FP1). Se estudió el perfil de pesos moleculares y la composición de aminoácidos de FP1, así como su actividad antioxidante por el método de secuestro de radicales libres (ABTS), antihipertensiva por el método de inhibición de la enzima

convertidora de angiotensina e hipoglucémica por el método de inhibición de la enzima dipeptidil peptidasa IV.

Se elaboraron liposomas de fosfatidilcolina purificada con cinco lavados (FC5) incorporando la fracción peptídica (L-FP1). Antes del primer calentamiento se incorporó la fracción peptídica (0,1:4, p/v) y antes del segundo calentamiento se añadió el glicerol (0,6:4, v/v). Paralelamente, se preparó una dispersión liposomal sin extracto bioactivo (L-V). De estas dispersiones se analizaron sus características de partícula mediante dispersión dinámica de luz en Zetasizer (dilución 1/10), eficacia de encapsulación y microscopía electrónica de transmisión.

Estos liposomas, tanto vacíos como encapsulando el bioactivo (fracción peptídica <1 kDa), se incorporaron en películas de caseinato sódico. Inicialmente, 8 g de caseinato sódico se disolvieron en 100 mL de buffer fosfato 10 mM pH 7. La mezcla se sometió a 5 ciclos de sonicación de 1 min a 90 % amplitud (120 W), con 1 min de parada entre ciclos. Seguidamente, se mezcló esta disolución con la dispersión liposomal (1:0,6, v/v), con y sin extracto bioactivo, mediante agitación magnética y las soluciones se vertieron en placas Petri, eliminando las posibles burbujas presentes en ellas. A la vez, se realizó una película control sin liposomas. Finalmente, las tres películas elaboradas (P: películas sin liposomas, P-L-V: películas con liposomas vacíos y P-L-FP1: películas con liposomas encapsulando la fracción peptídica <1 kDa de músculo de langostino) se secaron a 45 °C durante 12 h. Las placas se conservaron a temperatura ambiente y humedad controlada (58 %). También se preparó una formulación alternativa con los tres tipos de películas pero conservadas a una humedad relativa del 75 %. De las películas se estudió la presencia de liposomas en su estructura mediante microscopía electrónica de transmisión, sus propiedades físicas de contenido en agua, solubilidad en agua, espesor, transparencia y densidad, sus propiedades mecánicas de adherencia y mucoadhesión (incluyendo las formulaciones al 75 %) y sus propiedades sensoriales.

Resultados y discusión

Propiedades de la fracción peptídica <1 kDa (FP1)

Composición

La fracción peptídica de langostino liofilizada (FP1), presentada en forma de polvo blanquecino, mostró mayoría de residuos de glicina (18,5 %) y ácido glutámico (11,5 %), con importantes cantidades de alanina (9,0 %) y ácido aspártico (8,2 %) (Figura 91).

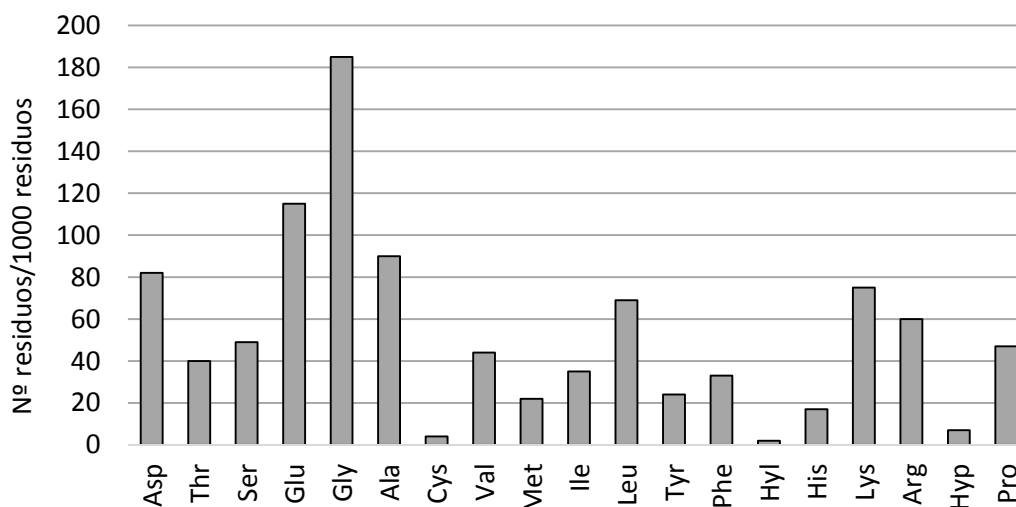


Figura 91. Composición de aminoácidos de la fracción peptídica de langostino (FP1).

Otros autores (Cobb et al., 1974; Mente et al., 2002; Chaurand et al., 2013) también encontraron abundancia de glicina y alanina en diferentes especies de crustáceos. Además, cabe destacar los residuos de hidroxilisina e hidroxiprolina, aminoácidos específicos del colágeno, atribuidos a la hidrólisis del tejido conectivo intramuscular. Teniendo en cuenta el cómputo de aminoácidos, el contenido total de residuos hidrofóbicos fue del 52 %.

La fracción FP1 presentó un perfil de pesos moleculares con dos poblaciones diferenciadas a $\lambda = 214$ nm, con valores medios en torno a 550 Da y a 200 Da (Figura 92). El perfil de pesos moleculares fue diferente a $\lambda = 280$ nm, con tres poblaciones diferenciadas de tamaños 490, 240 y 150 nm. Estos resultados indican la presencia de diferentes poblaciones de péptidos; las fracciones en torno a 200-240 Da corresponden a dipéptidos pequeños, las fracciones de 150 Da a residuos aromáticos libres, y las fracciones de 490 y 550 nm a péptidos conformados por 4-5 residuos. Cao et al. (2009) encontraron un rango relativamente similar (915-207 Da) en hidrolizados de langostinos empleando alcalasa como enzima de hidrólisis. Teniendo en cuenta la abundancia relativa de los diferentes aminoácidos observados en la figura 92, se podría esperar una elevada frecuencia de dipéptidos incluyendo glicina o alanina en la fracción de 200 Da. En cambio, la fracción de 240 Da contendría dipéptidos incluyendo residuos de tirosina, triptófano o fenilalanina.

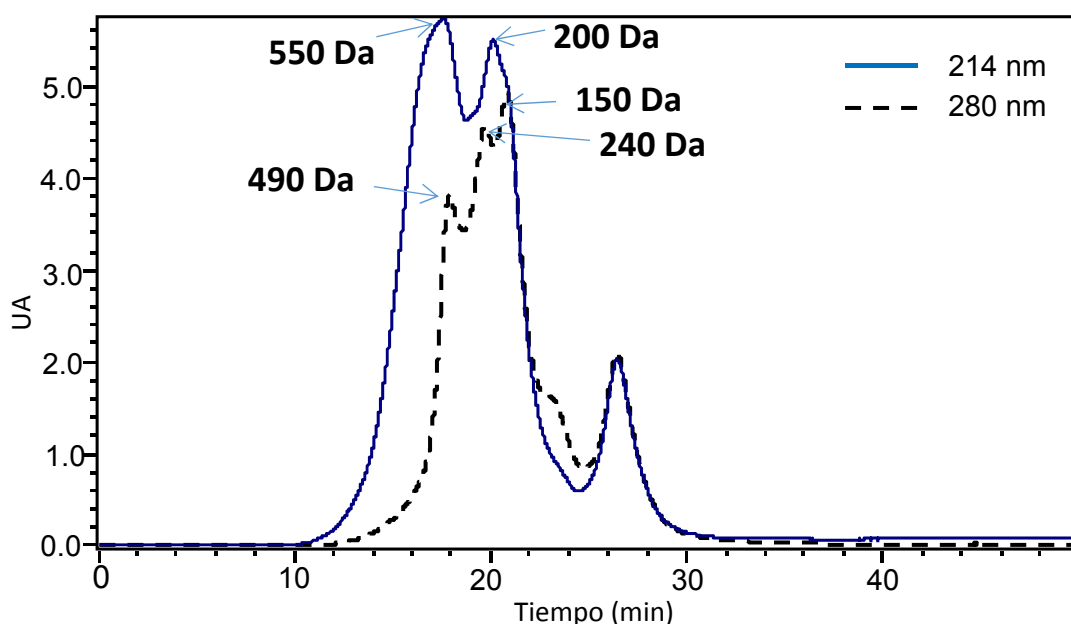


Figura 92. Distribución de pesos moleculares de la fracción peptídica de langostino (FP1).

Actividades biológicas

La actividad antioxidante de la fracción peptídica FP1 fue de 69,13 mg ácido ascórbico equivalente/gramo muestra. Alemán et al. (2016) obtuvieron un valor significativamente mayor (122,16 mg ácido ascórbico equivalente/g muestra) para una fracción peptídica <10 kDa de músculo de langostino (*Litopenaeus vannamei*) hidrolizada con alcalasa. La destacada actividad antioxidante de FP1 puede estar relacionada con la considerable gran cantidad de aminoácidos hidrofóbicos presentes en el extracto (Mendis et al., 2005), y más específicamente con la abundancia de prolina, alanina, valina y leucina.

La fracción FP1 también mostró una marcada actividad antihipertensiva ($IC_{50} = 74 \mu\text{g/mL}$), valor muy similar a los $70 \mu\text{g/mL}$ obtenidos por Cheung & Li-Chan (2010) para residuos de langostino (*Pandalopsis dispar*) hidrolizados con Protamex. La actividad antihipertensiva de FP1 puede deberse en parte a la gran cantidad de aminoácidos hidrofóbicos y de prolina presentes en la

cadena peptídica. También se asocia con la presencia de péptidos pequeños (Kim et al., 2012). Algunos de estos péptidos, contenidos en la BIOPEP DATABASE creada por Minkiewicz et al. (2008), podrían ser leucina-valina-tirosina-prolina (490 Da) o tirosina-alanina (252 Da).

La actividad hipoglucémica mostró un valor de $IC_{50} = 0,46$ mg/mL, ligeramente menor que el encontrado en otras fuentes proteicas como el caso de Ji et al. (2017) para la proteína de krill (0,83 mg/mL), Li-Chan et al. (2012) para gelatina de salmón atlántico (1,35 mg/mL) o Sila et al. (2015) para proteína de barbo argelino (1,94 mg/mL). La mayoría de los péptidos inhibidores de esta enzima contienen de 2 a 8 residuos de aminoácidos (Li-Chan et al., 2012; Sila et al., 2015). Pero el factor más determinante es la secuencia peptídica, ya que esta enzima presenta especificidad por sustratos del tipo X-alanina-Y y X-prolina-Y en el extremo N-terminal de la cadena peptídica (Yazbeck et al., 2009). De hecho, Ji et al. (2017) demostró que el binomio alanina-prolina es uno de los péptidos que actúa como inhibidor de la enzima. Este dipéptido bien podría estar presente en la fracción peptídica <1 kDa utilizada en el presente trabajo, dado que los aminoácidos alanina y prolina resultan ser los residuos hidrofóbicos más abundantes. La presencia de aminoácidos hidrofóbicos en la posición N-terminal también parece ser de importancia para la inhibición enzimática (Sila et al., 2015).

Propiedades de los liposomas

Características de partícula

Las características de partícula de la dispersión liposomal vacía (L-V) y la que contiene la fracción peptídica (L-FP1) se muestran en la tabla 38. El tamaño medio de L-FP1 fue de 99,98 nm, valor significativamente superior al de los liposomas vacíos (87,40 nm), debido a que la presencia del bioactivo produce una ligera expansión de la cápsula. Taylor et al. (2007) observaron un efecto similar para liposomas de fosfatidilcolina encapsulando nisina, sin relación entre la concentración de nisina y el tamaño promedio de los liposomas. En el presente trabajo, tanto las concentraciones de péptido como de fosfatidilcolina se seleccionaron de acuerdo a estudios previos (Mosquera et al., 2014). El índice de polidispersidad fue de 0,240 para L-V y 0,186 para L-FP1, ambos indicativos de una distribución de tamaños homogénea, acorde a Da Silva Malheiros et al. (2011).

Ambas dispersiones mostraron un potencial zeta muy electronegativo con valores de -35,53 mV para L-V y de -53,86 mV para L-FP1, reflejando así una gran estabilidad de membrana, significativamente mayor ($p \leq 0,05$) en la dispersión con la fracción peptídica. La composición de fosfolípidos y su interacción con el compuesto encapsulado pueden determinar la superficie de carga de los liposomas (Da Silva Malheiros et al., 2011). De hecho, la interacción química de los péptidos con la membrana de fosfolípidos podría ejercer un efecto estabilizante en las vesículas (Taylor et al., 2007). Los liposomas de fosfatidilcolina suelen presentar monocapas no cargadas o ligeramente aniónicas a valores de pH neutros (Bailey & Sullivan, 2000). Taylor et al. (2007) obtuvieron un potencial zeta para liposomas vacíos a partir de fosfatidilcolina de -8 mV, muy inferior al nuestro, lo que sugiere que otros lípidos e impurezas de la fosfatidilcolina parcialmente purificada pueden haber influido en la carga de membrana. Como se describió en el capítulo 1, en el experimento 8.1., el glicerol incluido en la producción de los liposomas no fue el responsable del elevado potencial zeta electronegativo. El glicerol se ha usado para mantener la integridad de las vesículas, prevenir la sedimentación de las mismas y la pérdida de los péptidos atrapados en la solución filmogénica, la cual se debe deshidratar posteriormente para producir la película de caseinato de sodio. Las vesículas lipídicas deshidratadas o liofilizadas en ausencia de un soluto protector pueden experimentar una fusión masiva con la liberación concomitante del material atrapado. A este respecto, se ha demostrado que la bicapa de vesículas de fosfatidilcolina presenta alta permeabilidad al glicerol, el cual a la concentración adecuada se equilibra a ambos lados de la membrana vesicular, dando lugar a una mayor protección contra la fuga inducida por congelación-descongelación (Mozafari, 2005). Por otro

lado, vesículas compuestas de fosfolípidos, glicerol y agua, los denominados gliosomas, se ha descrito que aumentan la fluidez de la bicapa liposomal (Manca et al., 2013).

Eficacia de encapsulación

La eficacia de encapsulación de FP1 en los liposomas fue del 52,37 %, siendo éste un valor intermedio entre los diferentes valores para péptidos descritos en la literatura, donde es posible encontrar valores entre 20 y 90 % (Were et al., 2003; Da Silva Malheiros et al., 2011; Mosquera et al., 2014). Esta eficacia depende en gran medida de las interacciones electrostáticas entre los péptidos y los fosfolípidos (Were et al., 2003). La fracción peptídica tiene un contenido en aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos equilibrado, lo que significa que la mitad del material puede localizarse en el núcleo acuoso o adherido a las cabezas polares de la superficie externa de membrana (parte polar), mientras que la otra mitad estaría interactuando con las colas hidrofóbicas de la bicapa lipídica (parte apolar) (Mozafari et al., 2008).

Tabla 38. Propiedades de partícula de tamaño medio (nm), índice de polidispersidad, potencial zeta (mV) y eficacia de encapsulación (%) de dispersiones liposomales vacías (L-V) y rellenas con la fracción peptídica de langostino (L-FP1). Diferentes letras (a, b) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre liposomas.

| | Tamaño Medio (nm) | Índice de polidispersidad | Potencial Zeta (mV) | Eficacia de encapsulación (%) |
|-------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| L-V | 87,39 \pm 0,82 ^a | 0,240 \pm 0,005 ^a | -35,53 \pm 1,68 ^a | - |
| L-FP1 | 99,98 \pm 4,00 ^b | 0,186 \pm 0,006 ^b | -53,86 \pm 2,91 ^b | 52,37 \pm 2,38 |

Microscopía electrónica de transmisión convencional

Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión de las dispersiones liposomales se muestran en la figura 93.

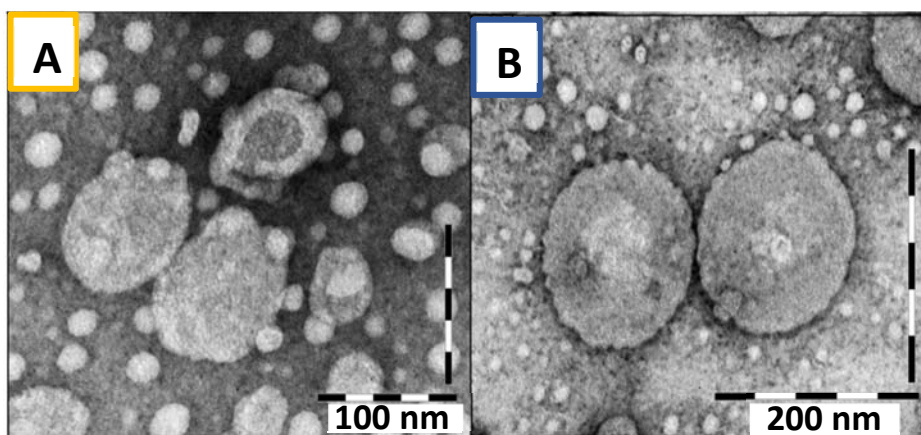


Figura 93. Microscopía electrónica de transmisión de dispersiones liposomales A) vacías (L-V) y B) rellenas con fracción peptídica de langostino (L-FP1).

Las vesículas de ambas muestras presentaron una morfología globular bien definida, más uniformemente dispersa en el caso de los liposomas vacíos (L-V) (Figura 93A). Además, la bicapa formada por las colas hidrofóbicas de la fosfatidilcolina fue más visible en L-V, lo que se atribuye a la interferencia del material peptídico más hidrofóbico en el interior de la bicapa lipídica, siendo además responsable del incremento del tamaño medio, así como de la excelente estabilidad liposomal. La dispersión L-FP1 (Figura 93B) mostró algunas zonas de aspecto reticulado alrededor de las vesículas, que corresponde a material peptídico interactuando con las cabezas polares de la fosfatidilcolina.

Propiedades de la película

La dispersión con la fracción peptídica encapsulada se incorporó a la formulación de películas comestibles preparadas con caseinato de sodio (P-L-FP1). Con el fin de determinar el efecto de la adición de liposomas con péptidos en las propiedades de la película, también se prepararon películas análogas con liposomas vacíos (P-L-V) y sin liposomas (P).

Microscopía electrónica de transmisión convencional

La integridad estructural de los liposomas en la película se verificó mediante microscopía electrónica de transmisión (Figura 94).

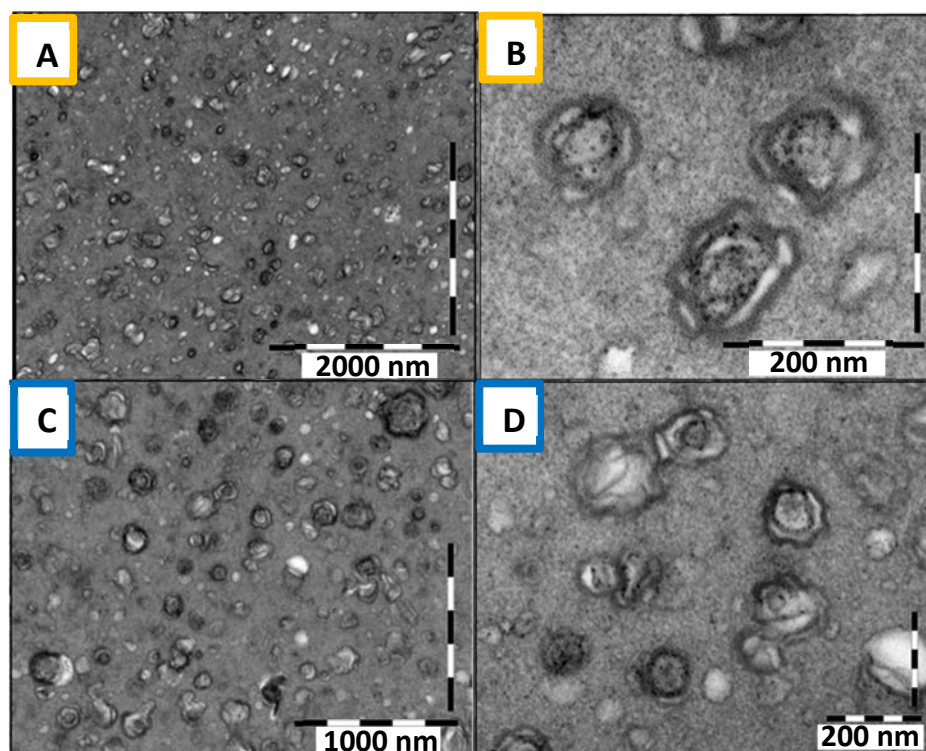


Figura 94. Microestructura de las películas obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión. A) y B) corresponden a películas con liposomas vacíos (P-L-V) y C) y D) a películas con liposomas rellenos (P-L-FP1), con diferentes grado de aumentos.

Ambos tipos de liposomas mostraron una distribución uniforme y se integraron bien en la matriz proteica de la película a pesar de provocar una evidente discontinuidad. Con respecto a la morfología liposomal, generalmente se observa una tendencia a perder la forma esférica, produciendo estructuras perimetrales más irregulares y ovals, mientras se mantiene en general la integridad estructural y el tamaño original. No se observó fusión vesicular o agregación evidente, independientemente del tipo de formulación liposomal. La bicapa lipídica fue claramente visible tanto en los liposomas vacíos como en los liposomas con péptidos.

Propiedades físicas

Las características de las películas se muestran en la tabla 39. El contenido en agua fue mayor ($p \leq 0,05$) en la película control sin liposomas (P, 37,58 %) respecto a las películas con liposomas (21,96 % para P-L-V y 28,49 % para P-L-FP1). Estas diferencias se deben al incremento en materia seca (fosfatidilcolina y extracto bioactivo) en las películas P-L-V y P-L-FP1. Además, la matriz discontinua inducida por la presencia de liposomas podría haber favorecido la eliminación de agua durante la etapa de deshidratación de la película.

Tabla 39. Contenido en agua (%), espesor (mm), densidad (g/cm³), solubilidad en agua (%) y transparencia de las películas, donde P: película control; P-L-V: película con liposomas vacíos; P-L-FP1: película con liposomas rellenos con fracción peptídica de langostino. Diferentes letras (a, b, c) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre películas.

| | Contenido en agua | Espesor | Densidad | Solubilidad | Transparencia |
|----------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| P | 37,58 ± 1,39 ^a | 0,10 ± 0,02 ^a | 1,07 ± 0,05 ^a | 37,58 ± 1,40 ^a | 1,07 ± 0,37 ^a |
| P-L-V | 21,96 ± 1,94 ^b | 0,09 ± 0,02 ^a | 1,15 ± 0,02 ^b | 91,52 ± 1,20 ^b | 1,00 ± 0,16 ^a |
| P-L-FP1 | 28,49 ± 1,26 ^c | 0,10 ± 0,03 ^a | 1,32 ± 0,01 ^c | 58,39 ± 2,40 ^c | 1,22 ± 0,02 ^a |

No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) para el espesor o el nivel de transparencia, lo que se atribuye al pequeño tamaño (rango nano) de los liposomas añadidos. Sin embargo, la incorporación de lípidos emulsionados (de tamaño medio 0,8-2,5 μm) en películas de caseinato sódico produjo un descenso evidente en la transparencia de las películas (Fabra et al., 2010).

Se observó un ligero incremento ($p \leq 0,05$) en la densidad de las películas cuando los liposomas fueron incorporados, más acusado para los liposomas incorporando la fracción peptídica. Esto se debe a que a mayor cantidad de componentes en la formulación liposomal y en la formulación de la película, mayor densidad tendrá la misma, sin modificar los parámetros de espesor o transparencia. Esta diferencia de densidad se puede observar claramente en la figura 95.

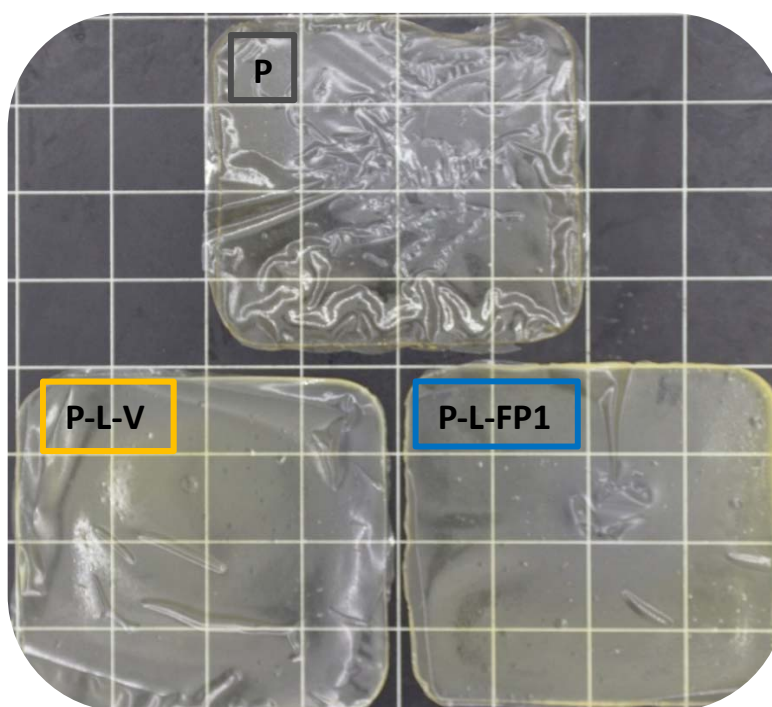


Figura 95. Aspecto visual de las películas de caseinato sódico.

Ambas películas con liposomas fueron significativamente más solubles en agua que la película sin las nanovesículas, a pesar de la naturaleza hidrofóbica de la fosfatidilcolina empleada como material encapsulante. Este aumento de solubilidad podría deberse a la discontinuidad que producen los liposomas en la matriz agregada de caseinato sódico, más pronunciadamente cuando se incluyen los liposomas vacíos. La fracción peptídica no encapsulada en P-L-FP1 probablemente contribuiría a reducir la discontinuidad de la matriz proteica al favorecer las

interacciones peptídicas que conducen a una notable menor solubilidad en agua con respecto a aquellas matrices que contienen liposomas vacíos.

Propiedades mecánicas

Se determinaron las propiedades mecánicas de las películas mediante los parámetros de adherencia y mucoadhesividad (Tabla 40). Diversos autores describen que el mecanismo de mucoadhesión requiere tres etapas sucesivas: el contacto (adhesión), la interpenetración y la consolidación (Ivarsson & Wahlgren, 2012). Para la primera fase de adhesión, el estado físico es principalmente influenciado por el estado de hidratación; en la segunda, se establece el contacto entre los polímeros altamente adhesivos y el epitelio de la mucosa; y en la tercera, se establecen los enlaces mecánicos y químicos (Sandri et al., 2015).

Asumiendo la importancia de la hidratación, y dado que presumiblemente la absorción a nivel oral es prácticamente instantánea, y que la película se disolvería muy rápidamente, las medidas se han llevado a cabo en paralelo en películas con dos grados de humedad relativa diferentes: 58 % y 75 %, que es una humedad considerablemente más alta, pero aún permite que estas películas se manejen fácilmente.

Los valores de la mucoadhesión son mucho más altos que los que se muestran para la prueba de adherencia, lo que es indicativo de un efecto mucoadhesivo de la película (Ivarsson & Wahlgren, 2012). Este efecto se observó para ambas humedades relativas, aunque las diferencias son menores a 75 % (la relación mucoadhesión/adherencia a 58 % de humedad relativa osciló entre 74,59 y 38,97, mientras que a 75 % entre 33,34 y 18,32). A 58 % de humedad relativa, se pudo observar un aumento significativo de la adherencia y la mucoadhesión con la inclusión de liposomas dentro de la película, y aún más cuando éstos llevaron péptidos incorporados. Este efecto se atribuye al efecto plastificante de los liposomas que favorecen la discontinuidad y una mayor solubilización de la matriz biopolimérica. Sin embargo, al 75 % de humedad relativa, en la prueba de mucoadhesión no hay diferencias significativas, probablemente porque a esta humedad la matriz es bastante más laxa.

Tabla 40. Propiedades mecánicas de adherencia y mucoadhesión, expresadas como fuerza máxima (N), de películas a distintas humedades relativas (58 % y 75 %), donde P: película control; P-L-V: película con liposomas vacíos; P-L-FP1: película con liposomas rellenos de fracción peptídica de langostino. Diferentes letras (a, b, c) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre películas para un mismo parámetro y humedad relativa y (x, y) en la misma fila entre humedades relativas para un mismo parámetro y película.

| | Adherencia | Mucoadhesividad | Adherencia | Mucoadhesividad |
|----------------|----------------------------|-------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| | 58 % | | 75 % | |
| P | 1,18 ± 0,00 ^{a/x} | 87,64 ± 1,95 ^{a/x} | 4,23 ± 0,04 ^{a/y} | 140,92 ± 12,70 ^{a/y} |
| P-L-V | 2,34 ± 0,20 ^{b/x} | 127,45 ± 6,85 ^{b/x} | 6,58 ± 0,21 ^{b/y} | 170,27 ± 5,01 ^{b/y} |
| P-L-FP1 | 3,55 ± 0,30 ^{c/x} | 138,32 ± 10,24 ^{c/x} | 9,58 ± 0,88 ^{c/y} | 175,48 ± 4,10 ^{c/y} |

Análisis sensorial

Dado que el requisito de estas películas es que se disuelvan en la boca, ya sea con la intención de mejorar la palatabilidad o con la intención de que los liposomas pasen a través de la mucosa

bucal y sublingual a los capilares sanguíneos, con la posterior liberación del bioactivo encapsulado, las propiedades de disolución fácil y rápida son de gran interés.

De acuerdo con Souza et al. (2009), la solubilidad deseada en una película comestible depende de la función requerida, de modo que películas menos solubles podrían usarse para proteger productos con humedad elevada, mientras que las películas altamente solubles en agua podrían servir como vehículos bioactivos y permitir la absorción en la cavidad oral (Heinemann et al., 2013).

Se realizó una evaluación sensorial de las películas (Figura 96). Durante la disolución en la boca, ninguna de las tres películas mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) en la intensidad de salivación, que fue baja, o una incómoda sensación de adherencia a los dientes. Tampoco hubo diferencias significativas en el sabor, que los jueces describieron como un sabor agradable y que recordaba a leche y/o a caramelo, lo cual se atribuyó a la presencia de caseína y al tratamiento térmico moderado para su preparación. No hubo signos de amargor o astringencia que pudiera causar la presencia de aminoácidos o péptidos libres. En cuanto al tiempo de disolución de la película, todos los jueces consideraron que el tiempo fue en general "corto" para las 3 muestras. Sin embargo, se observaron diferencias notables entre los que contenían liposomas (reellenos o vacíos), que demoraban no más de 40 segundos, y los que no tenían liposomas, que tardaban más tiempo en disolverse, entre 40 s y 80 s ($p \leq 0,05$). Como se discutió anteriormente, los liposomas produjeron cierta discontinuidad en la matriz de la película, lo que facilita su desintegración y su mayor solubilidad.

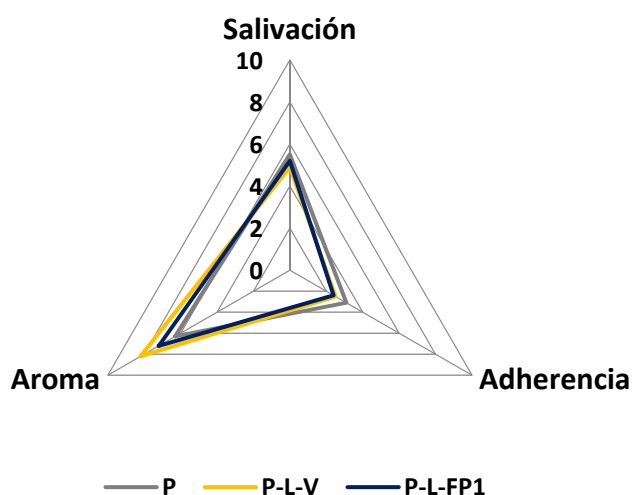


Figura 96. Atributos sensoriales de salivación, aroma y adherencia (0-10) de películas de caseinato sódico conteniendo liposomas (P: película control; P-L-V: película con liposomas vacíos; P-L-FP1: película con liposomas reellenos de fracción peptídica de langostino).

Todos los parámetros estudiados son factores que pueden influir en el prototipo de una película transportadora de liposomas encapsulando péptidos, siendo estos liposomas buenos candidatos para la obtención de películas funcionales destinadas a que sus compuestos bioactivos sean absorbidos por las membranas de las mucosas de la cavidad oral, o bien sean a modo de envoltura, como nuevo diseño de un producto funcional con palatabilidad mejorada. En los últimos años, algunos autores han indicado que estas características son las apropiadas para la absorción vía oral y sublingual (Masek et al., 2017). Esta absorción tiene la particularidad de ser rápida y directa, previniendo la degradación de los compuestos activos en el tracto

gastrointestinal, siendo además un método atractivo cuando se compara con los métodos tradicionales para personas con dificultades al deglutir (Heinemann et al., 2013).

Conclusiones

Una fracción peptídica de bajo peso molecular (<1 kDa) procedente de langostino sin valor comercial, con actividad biológica (antioxidante, antihipertensiva e hipoglucémica), fue encapsulada en liposomas de fosfatidilcolina de soja parcialmente purificada. Estos liposomas presentaron un tamaño medio de ≈ 100 nm, una elevada estabilidad de partícula y una eficacia de encapsulación del 52 %. La adición de estos liposomas en películas comestibles de caseinato sódico no afecta aparentemente a la estabilidad estructural de las películas, pero causa discontinuidades internas en la matriz, incrementando su solubilidad en agua. La capacidad de mucoadhesión de la película se vio favorecida por el aumento de la humedad de la película y la presencia de liposomas, especialmente cuando encapsulan la fracción peptídica. Las películas resultantes tienen características sensoriales apropiadas para disolverse rápidamente en la boca, especialmente las que contienen liposomas, con un sabor muy agradable y mejorando la palatabilidad.

8.9. PELÍCULAS DE CARBOXIMETILCELULOSA CONTENIENDO NANOLIPOSOMAS ENCAPSULANDO UN HIDROLIZADO DE COLÁGENO CON CAPACIDAD INHIBITORIA DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA

Resumen

Se encapsuló un hidrolizado de colágeno procedente de tónicas del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en liposomas de fosfatidilcolina de soja parcialmente purificada, en presencia y ausencia de glicerol. El tamaño medio de los liposomas estuvo entre 92,4 y 96,0 nm, mientras que el potencial zeta varió desde -30,4 hasta -34,5 mV. La eficacia de encapsulación fue del 80-83 %, con una capacidad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (actividad antihipertensiva) del ≈ 50 %. Las dispersiones liposomales se incorporaron en películas de carboximetilcelulosa, comparando dos modos de incorporar el glicerol: directamente sobre la solución de carboximetilcelulosa o previamente incluido en los liposomas. La microscopía electrónica de transmisión a temperaturas criogénicas corroboró la presencia de los liposomas en las películas, los cuales inducen una disminución de la solubilidad de la película así como un incremento de su adhesividad. Los resultados demostraron que los liposomas resistieron el proceso de secado de la película y también el posterior proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*, tras el cual los liposomas vieron incrementado su potencial antihipertensivo, independientemente de la presencia o ausencia de glicerol. Además, aquellos liposomas que contenían glicerol preservaron mejor el tamaño y la morfología de sus vesículas que la formulación donde el glicerol se añadió directamente sobre la solución que origina la película.

Palabras clave: hidrolizado de colágeno, liposomas de fosfatidilcolina, glicerol, películas, digestión gastrointestinal *in vitro*, actividad antihipertensiva.

Introducción

Una alternativa para la obtención de productos alimentarios de alto valor añadido sería el empleo de materiales residuales procedentes de la industria alimentaria o incluso de materias primas infrautilizadas. Esta acción implica que estos residuos no sean eliminados y puedan ser explotados y revalorizados, dándoles un uso integral, lo que tendría importantes repercusiones beneficiosas desde el punto de vista medioambiental y económico, con la posibilidad de obtener co-productos o productos de alto valor añadido (Sayari et al., 2016). En este aspecto, existe un creciente interés en la obtención de hidrolizados proteicos a partir de residuos de la industria pesquera (López-Caballero et al., 2013), dado que son excelentes fuentes de péptidos bioactivos con propiedades antioxidantes y antihipertensivas (Cudennec et al., 2008), representando un material atractivo para la elaboración de productos alimentarios funcionales.

Sin embargo, estos péptidos bioactivos son susceptibles de degradación proteolítica y/o de pérdida de funcionalidad durante su proceso de preparación o de conservación (Chollet et al., 2008), efectos más pronunciados si además son sometidos a digestión gastrointestinal debidos al pH ácido y a las enzimas. Además, también pueden aportar ciertos sabores desagradables o amargor que afectan negativamente a la aceptación sensorial. Hay diversas estrategias para proteger a los bioactivos y enmascarar sus características, como la encapsulación en nanoliposomas.

Los liposomas son estructuras vesiculares coloidales de naturaleza anfipática capaces de englobar y proteger compuestos bioactivos de cualquier naturaleza (Mozafari et al., 2008), incluyendo péptidos o hidrolizados peptídicos, manteniendo inalterable su actividad (Da Silva Malheiros et al., 2010). Existen estudios previos con liposomas encapsulando fracciones peptídicas con capacidad antihipertensiva, sin embargo, aún no se ha estudiado su

comportamiento, estabilidad y potencial antihipertensivo después de ser sometidos a una digestión gastrointestinal *in vitro*.

En las últimas décadas hay un interés creciente en el uso de películas para proteger a los liposomas y los bioactivos encapsulados en su interior (Cui et al., 2017b), sobre todo a partir de polímeros naturales para su aplicación como envase o protección de alimentos (Boelter & Brandelli, 2016). A día de hoy, la mayoría de películas para recubrimiento empleadas para preservar las propiedades de los alimentos son sintéticas. Sin embargo, el uso de películas comestibles o biodegradables es una tecnología útil para proteger las potenciales actividades, evitar problemas medioambientales y mejorar la sostenibilidad del procesado (Pérez-Mateos et al., 2009). Estas películas para recubrimiento favorecen el mantenimiento de la estructura de los liposomas y de la actividad bioactiva (Campos et al., 2018) mediante su acción como barrera frente a la humedad, oxígeno, dióxido de carbono, aditivos o compuestos intrínsecos de los alimentos (Wu et al., 2015), mejorando la liberación controlada del bioactivo dentro del organismo (Chirra & Desai, 2012). Además, estas películas constituyen un alimento funcional por sí mismas.

La carboximetilcelulosa es un compuesto orgánico natural no tóxico con propiedades espesantes, típicas de un polímero derivado de la celulosa, que es el material orgánico más abundante en la naturaleza. En la bibliografía no hay muchos estudios acerca de películas de carboximetilcelulosa incorporando liposomas y ninguno con liposomas encapsulando péptidos antihipertensivos. Sin embargo, Silva-Weiss et al. (2018) diseñaron películas de carboximetilcelulosa incorporando liposomas rellenos de polifenoles como la quercetina o la rutina; Imran et al. (2012) incorporaron liposomas rellenos de nisina en películas de hidroxipropilmetilcelulosa que emplearon como envoltorio de alimentos; y Alemán et al. (2016) obtuvieron películas basadas en proteína muscular procedente de langostino a las que se incorporaron liposomas rellenos de péptidos con una excelente actividad antihipertensiva. El tipo de biopolímero puede determinar las propiedades finales de la película.

El glicerol es un compuesto habitualmente adicionado durante la elaboración de películas a base de polímeros, dado que es capaz de incrementar el estado de fluidez (Manca et al., 2013) y proteger contra el proceso de deshidratación (Stark et al., 2010), evitando la rotura de las películas. Su modo de inclusión en las películas podría determinar las propiedades de las mismas. La presencia de liposomas y glicerol podrían conferir propiedades adhesivas y mucoadhesivas sobre la película, favoreciendo así en el tracto intestinal la adhesión de la película a la membrana del intestino y sus mucosas durante el proceso de digestión gastrointestinal, mejorando de este modo la absorción intestinal de los liposomas.

Objetivos

El objetivo de este trabajo experimental fue evaluar la estabilidad y bioaccesibilidad de liposomas de fosfatidilcolina de soja parcialmente purificada incorporando un hidrolizado de colágeno procedente de tónicas del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) y embebidos en películas comestibles de carboximetilcelulosa. En este trabajo se busca evaluar la importancia del modo de inclusión del glicerol (adicionado directamente en la solución de carboximetilcelulosa o incluido previamente en los liposomas) y su efecto plastificante, así como la influencia de una digestión gastrointestinal *in vitro* sobre la integridad estructural y la actividad antihipertensiva de los liposomas.

Materiales y métodos

Inicialmente, se extrajo fosfatidilcolina parcialmente purificada tras cinco lavados (FC5) a partir de lecitina de soja (LS).

Seguidamente, se llevó a cabo la obtención del hidrolizado de colágeno (HC) procedente de tónicas del manto del calamar gigante (*Dosidicus gigas*), caracterizándose su perfil de aminoácidos, su contenido proteico total, su distribución de pesos moleculares y su potencial antihipertensivo antes y después de ser digerido durante 4 horas.

A continuación, se elaboraron liposomas de fosfatidilcolina purificada mediante cinco lavados, tanto vacíos (L-V) como rellenos de hidrolizado de colágeno (L-HC). El hidrolizado se incorporó al buffer fosfato antes del primer calentamiento en una concentración de 2 mg/mL y el crioprotector (glicerol) antes del segundo calentamiento en una proporción 0,6 mL/g fosfatidilcolina, obteniendo así los liposomas L-V, L-V-G, L-HC y L-HC-G. Se estudiaron las características de partícula mediante dispersión dinámica de luz en Zetasizer (dilución 1/10) y la eficacia de encapsulación, así como la capacidad antihipertensiva por el método de la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina de todas las dispersiones liposomales.

Seguidamente, las suspensiones liposomales conteniendo el hidrolizado de colágeno, sin y con glicerol (L-HC y L-HC-G), se incorporaron en películas de carboximetilcelulosa sódica. Este polímero se disolvió al 4 % en agua desionizada y la disolución resultante se mezcló con la solución liposomal en proporción 1:1. En la muestra que no contenía glicerol en la formulación liposomal (L-HC), se adicionó el glicerol a la solución a la misma proporción a la que se encuentra éste contenido en los liposomas (L-HC-G), siendo esta cantidad de 4,8 mL. Las soluciones finales fueron vertidas en placas Petri y secadas a 45 °C durante 24 horas. Las películas obtenidas (P-L-HC+G y P-L-HC-G) se acondicionaron hasta una humedad relativa del 58 %. Con propósitos de comparación, se elaboraron dos películas control sin liposomas utilizando buffer fosfato pH 7 como sustituto de la dispersión (proporción 1:1 con la solución del polímero), una de ellas conteniendo únicamente glicerol (P+G) y la otra incorporando glicerol e hidrolizado de colágeno (P+G+HC), manteniendo las proporciones de glicerol (4,8 mL) y de hidrolizado de colágeno (0,320 g). De las cuatro películas desarrolladas se estudió la integridad estructural de las vesículas mediante microscopía electrónica de transmisión por criofijación (10-20 mg/mL, 4 µL); las propiedades físicas de humedad, solubilidad en agua, transparencia, espesor y color; las propiedades mecánicas mediante el test de adhesividad y el test de tracción (resistencia a la tracción y elongación hasta rotura); y la capacidad antihipertensiva (inhibición de la enzima convertidora de angiotensina).

Finalmente, los liposomas rellenos fueron sometidos posteriormente a una digestión gastrointestinal *in vitro*, caracterizándose de los digeridos su capacidad antihipertensiva, en función del número de horas de digestión (dos horas de digestión gástrica y a continuación dos horas de digestión intestinal). Para comparar el efecto protector de los liposomas durante la digestión gastrointestinal *in vitro*, el hidrolizado en forma libre también fue sometido a digestión de forma similar (4 horas). Las películas formuladas con liposomas (P-L-HC+G y P-L-HC-G) se sometieron a una digestión gastrointestinal *in vitro* y se estudió su integridad por microscopía electrónica de transmisión por criofijación y su capacidad antihipertensiva, en función del número de horas de digestión (4 horas).

Resultados y discusión

Caracterización del hidrolizado de colágeno (HC)

El hidrolizado de colágeno es el mismo que el utilizado en los capítulos 2 (diseño experimental 8.2.) y 3 (diseño experimental 8.7.), y la caracterización del hidrolizado de colágeno (HC) está descrita en el diseño experimental 8.7. del capítulo 3.

Caracterización de liposomas

Características de partícula

Las características de partícula (tamaño medio, índice de polidispersidad y potencial zeta) de las suspensiones liposomales se muestran en la tabla 41. Las dispersiones mantuvieron un tamaño medio nanométrico similar ($p > 0,05$) con valores comprendidos entre 92,4 y 96,0 nm. Del mismo modo, los valores del índice de polidispersidad estuvieron comprendidos en un estrecho rango de valores, de 0,235 a 0,319. La adición de glicerol contribuye a incrementar ligeramente la polidispersidad únicamente en el caso de los liposomas vacíos. Acorde a Da Silva Malheiros et al. (2011), quien establece valores entre 0,2-0,3 como buenos índices de polidispersidad para sistemas elaborados a partir de material biológico, todas las dispersiones mostraron buena polidispersidad.

El potencial zeta, comprendido entre -30,4 y -34,5 mV ($p \leq 0,05$), es indicativo de la superficie de carga de la membrana externa de las vesículas y por tanto de la estabilidad de membrana. Valores de potencial más electronegativos de -30 mV reflejan una elevada estabilidad de membrana, según Müller et al. (2001), por lo que todas las dispersiones liposomales ensayadas presentaron una excelente estabilidad vesicular.

No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las características de partícula (tamaño medio, polidispersidad y potencial zeta) de las suspensiones en función de la adición del hidrolizado de colágeno o del glicerol, probablemente porque el glicerol está fuertemente asociado a las cabezas polares de los fosfolípidos y el hidrolizado de colágeno está eficientemente encapsulado ya sea en el núcleo del liposoma o bien interaccionando con las cabezas polares de la superficie de membrana. Los liposomas cargados con HC presentaron una elevada eficacia de encapsulación, con valores del 80,0 % para L-HC y del 82,9 % para L-HC-G, demostrando que la adición de glicerol apenas modifica la eficacia de encapsulación.

Tabla 41. Tamaño medio (nm), índice de polidispersidad y potencial zeta (mV) de dispersiones liposomales. Diferentes letras (a, b, c) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre liposomas.

| | Tamaño medio (nm) | Índice de polidispersidad | Potencial zeta (mV) |
|--------|-------------------------|------------------------------|---------------------------|
| L-V | 96,0 ± 1,5 ^a | 0,271 ± 0,030 ^{ab} | -30,4 ± 1,9 ^c |
| L-V-G | 94,2 ± 0,8 ^a | 0,319 ± 0,039 ^b | -33,4 ± 0,6 ^{ab} |
| L-HC | 95,4 ± 2,2 ^a | 0,235 ± 0,006 ^a | -34,5 ± 0,4 ^a |
| L-HC-G | 92,4 ± 0,4 ^a | 0,255 ± 0,005 ^a | -31,5 ± 0,4 ^{bc} |

Caracterización de las películas de carboximetilcelulosa

Los liposomas encapsulando el hidrolizado de colágeno (L-HC y L-HC-G) se incorporaron en películas de carboximetilcelulosa y se adicionó glicerol a la que contenía L-HC (a la misma concentración que el glicerol contenido en los liposomas L-HC-G), obteniéndose dos películas con los mismos componentes a las mismas concentraciones (P-L-HC+G y P-L-HC-G) pero con el glicerol incorporado de diferente manera (libre o en los liposomas). Con propósitos comparativos, se diseñaron y caracterizaron dos películas control, una con glicerol (P+G) y otra con glicerol e hidrolizado de colágeno (P+G+HC), ambas formulados con buffer fosfato en vez de dispersión liposomal. El glicerol se añadió en todas las formulaciones ya que es un compuesto plastificante que aporta flexibilidad a las películas, evitando su rotura. Además, protege a la membrana liposomal durante el proceso de secado de la película, evitando la agregación de las vesículas.

Microscopía electrónica de transmisión a temperatura criogénica

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión por criofijación de las películas disueltas en agua (Figura 97) mostraron que los liposomas son resistentes al proceso de secado durante la elaboración de las películas, con predominancia de vesículas unilamelares esféricas, aunque se observan algunos casos de invaginación, de bi- o multilamellaridad e incluso de estructuras multivesiculares. En las películas con glicerol adicionado directamente (P-L-HC+G) (Figura 97A y 97B), se observó una mayor proporción de vesículas grandes (superiores a 200 nm), mientras que en las películas con el glicerol incluido dentro de los liposomas (P-L-HC-G) (Figura 97C y 97D) predominaron las vesículas de pequeño tamaño (inferiores a 200 nm), indicando que esta última estructura vesicular fue mejor preservada.

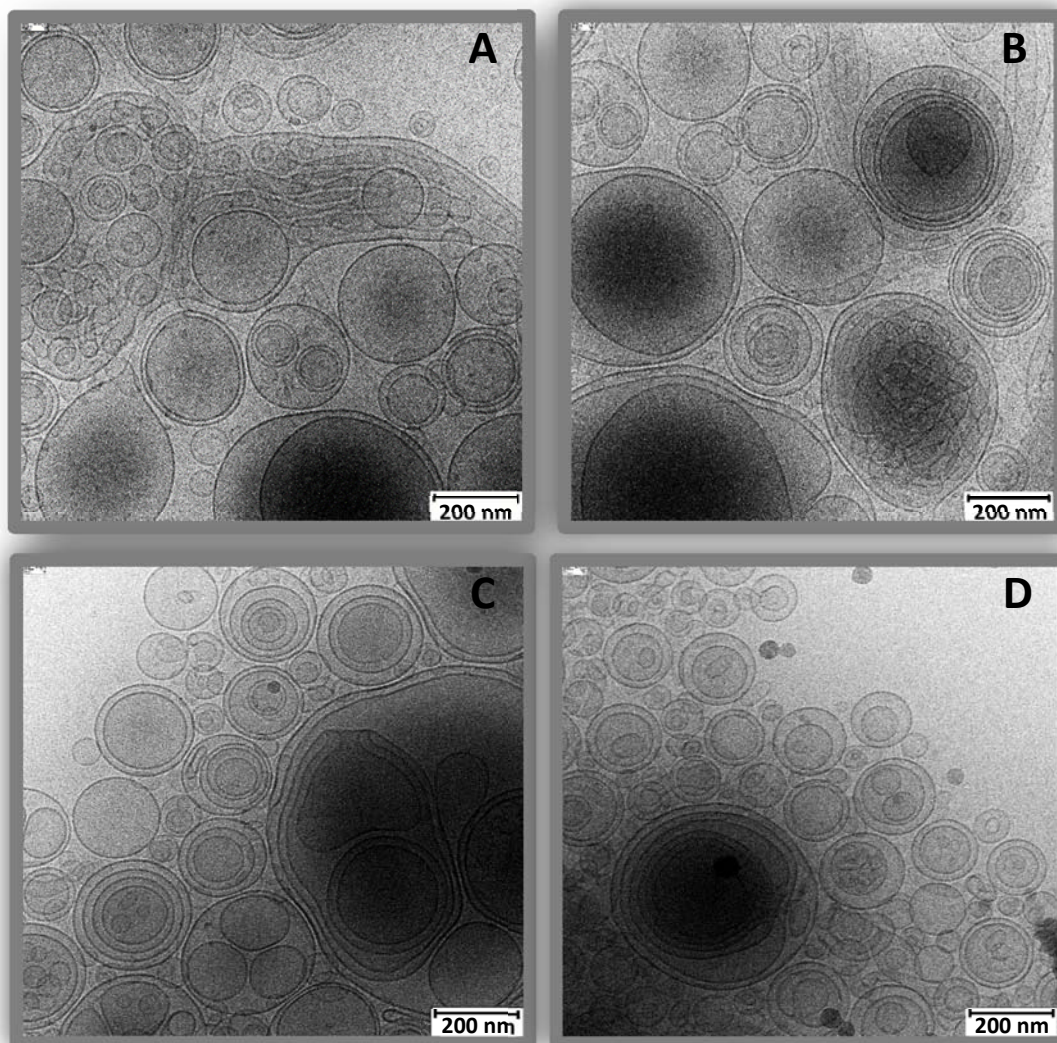


Figura 97. Microscopía electrónica de transmisión por criofijación de películas disueltas conteniendo liposomas. A y B: películas con glicerol y liposomas rellenos de hidrolizado de colágeno (P-L-HC+G). C y D: películas con liposomas rellenos de hidrolizado de colágeno y glicerol (P-L-HC-G).

Color

El color de las películas, según se analiza por los parámetros de color del sistema CIELAB L^* (luminosidad, 0-100), a^* (intervalo rojo-verde), b^* (intervalo amarillo-azul), y el índice de blancura, se muestra en la tabla 42. Las cuatro películas mostraron valores similares de luminosidad y estuvieron dentro de un estrecho rango de valores para el intervalo rojo-verde (a^*), mostrando las películas sin liposomas una ligera menor luminosidad y mayor tendencia a

una coloración verdosa ($p \leq 0,05$). Sin embargo, respecto al intervalo amarillo-azul (b^*), las películas con liposomas mostraron una clara tendencia positiva, atribuido al característico color amarillento de los liposomas. El índice de blancura fue similar en ambas películas con liposomas ($p > 0,05$), pero notablemente menor que aquéllas que no los incorporan. La diferencia total de color (ΔE) por la incorporación del hidrolizado de colágeno en la formulación de la película fue bastante baja (0,76). Por el contrario, cuando se incorporaron los liposomas la diferencia de color fue considerablemente mayor (8,38 para P-L-HC+G y 8,63 para P-L-HC-G), sin diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$).

Tabla 42. Parámetros de color L^* (luminosidad, 0-100), a^* (rango rojo-verde), b^* (rango amarillo-azul) e índice de blancura de las películas, donde P+G: película con glicerol; P+G+HC: película con glicerol y con hidrolizado de colágeno; P-L-HC+G: película con glicerol y con liposomas incorporando hidrolizado de colágeno; P-L-HC-G: película con liposomas incorporando hidrolizado de colágeno y glicerol. Diferentes letras (a, b, c) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre películas.

| | L^* | a^* | b^* | Blancura |
|----------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| P+G | $30,38 \pm 0,59^a$ | $-0,43 \pm 0,07^b$ | $-0,74 \pm 0,12^a$ | $32,60 \pm 0,95^a$ |
| P+G+HC | $30,16 \pm 0,25^a$ | $-0,60 \pm 0,05^a$ | $-0,04 \pm 0,13^b$ | $30,27 \pm 0,42^b$ |
| P-L-HC+G | $31,85 \pm 0,22^b$ | $-0,34 \pm 0,18^b$ | $7,48 \pm 0,56^c$ | $9,41 \pm 1,80^c$ |
| P-L-HC-G | $31,86 \pm 0,21^b$ | $-0,13 \pm 0,20^c$ | $7,73 \pm 0,56^c$ | $8,66 \pm 1,67^c$ |

Propiedades físicas

El contenido de humedad (Tabla 43) fue inferior en las películas formuladas con liposomas respecto a las que no contienen liposomas, debido a la mayor cantidad de materia seca (fosfatidilcolina) en las primeras formulaciones. Valencia-Sullca et al. (2016) obtuvieron resultados similares de humedad (24 %) para películas de quitosano incorporando liposomas de lecitina. En el diseño experimental anterior (8.8.) se ha observado un comportamiento similar al incorporar liposomas en películas comestibles de caseinato sódico, indicando que la presencia de liposomas en las películas produce discontinuidades en la matriz que favorecen la eliminación del agua durante el proceso de secado de la película.

Tabla 43. Propiedades físicas de las películas, donde P+G: película con glicerol; P+G+HC: película con glicerol y con hidrolizado de colágeno; P-L-HC+G: película con glicerol y con liposomas incorporando hidrolizado de colágeno; P-L-HC-G: película con liposomas incorporando hidrolizado de colágeno y glicerol. Diferentes letras (a, b) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre películas.

| | Humedad (%) | Solubilidad (%) | Espesor (μm) | Opacidad |
|----------|------------------|------------------|---------------------------|-------------------|
| P+G | $31,8 \pm 3,9^b$ | $66,1 \pm 9,5^b$ | 207 ± 50^a | $3,58 \pm 0,25^b$ |
| P+G+HC | $32,8 \pm 2,8^b$ | $59,1 \pm 5,1^b$ | 215 ± 31^a | $4,78 \pm 0,19^c$ |
| P-L-HC+G | $24,2 \pm 2,0^a$ | $37,6 \pm 3,8^a$ | 342 ± 25^b | $1,89 \pm 0,21^a$ |
| P-L-HC-G | $21,7 \pm 2,9^a$ | $37,6 \pm 5,1^a$ | 328 ± 39^b | $1,29 \pm 0,46^a$ |

Esta menor humedad en las películas que contienen liposomas condujo a una menor solubilidad en agua (Tabla 43) de dichas películas (37,6 %), en contraste con las que no contenían liposomas (66,1-59,1 %). Valencia-Sullca et al. (2016) obtuvieron resultados casi idénticos (37 %) para películas de quitosano con liposomas. Además, la naturaleza hidrofóbica de la fosfatidilcolina podría favorecer la baja solubilidad en agua de las películas que contienen liposomas de fosfatidilcolina parcialmente purificada. De acuerdo a Souza et al. (2009), la solubilidad de una película comestible determina su futura función, de modo que aquellas menos solubles podrían emplearse como protectoras de alimentos. Dada la baja solubilidad cuantificada en las películas

comestibles estudiadas, éstas podrían destinarse a funcionar como recubrimientos de otros alimentos de baja humedad.

El espesor medio (Tabla 43) fue superior en las películas formuladas con liposomas respecto a las formuladas sin ellos, probablemente atribuido al mayor contenido en materia seca, dado que la adición del péptido no incrementa significativamente el espesor de la película. Hay que tener en cuenta que el relativo elevado espesor obtenido ($>200\ \mu\text{m}$) fue producido intencionadamente mediante el empleo de una solución de carboximetilcelulosa al 4 %, para permitir la carga de una alta cantidad de liposomas en las películas sin comprometer la integridad de la película ni su posterior manejo. Cui et al. (2017a) observaron un incremento de espesor en películas de quitosano tras la adición de liposomas de lecitina-colesterol mientras que Alemán et al. (2016) no observaron diferencias de espesor cuando incorporaron liposomas conteniendo un hidrolizado proteico en películas de proteína miofibrilar de langostino cocido. Cui et al. (2017a) indicaron que el espesor de una película depende de la composición de la misma y de las interacciones que se establezcan tras la adición de los diferentes componentes.

Las películas conteniendo liposomas mostraron un menor grado de opacidad (mayor transparencia) (Tabla 43). Rodsmran & Sothornvit (2018) obtuvieron un grado de transparencia similar (3,2) para películas carboximetilcelulosa incorporando microcápsulas. En términos generales las películas de carboximetilcelulosa elaboradas no fueron muy transparentes, aunque la adición de liposomas incrementa notablemente este parámetro, favoreciendo su versatilidad de aplicación en alimentos, puesto que a menudo se desea que el producto pueda ser visualizado sin cobertura que lo enmascare.

Propiedades mecánicas

La capacidad de adhesión de las películas, determinada como la fuerza máxima requerida para separar la película de una superficie, se muestra en la tabla 44. La adhesividad fue similar ($p>0,05$) en ambas películas sin liposomas, por lo que el hidrolizado peptídico no influye en las propiedades mecánicas de las películas. Los valores de adhesividad fueron mayores ($p\leq 0,05$) para las películas formuladas con liposomas, debido al efecto plastificante que ejercen éstos, incrementando así la fuerza necesaria para despegarlas. En el diseño experimental anterior (8.8.) se observó un comportamiento similar al incorporar liposomas en películas de caseinato sódico trabajando bajo condiciones idénticas de humedad relativa (58 %). La mayor capacidad de adhesividad de las películas incorporando liposomas les hace ser estructuras apropiadas para actuar como recubrimientos de otros productos, quedándose bien adheridas a ellos. Entre ellas, la que contiene el glicerol añadido directamente (P-L-HC+G) mostró un valor superior ($p\leq 0,05$) respecto a la que lo tiene dentro de los liposomas (P-L-HC-G), siendo los valores de 429,32 y de 392,13 mN, respectivamente, sugiriendo que el glicerol interactúa en mayor medida con la película cuando éste es incorporado en forma libre, confirmando el efecto plastificante de dicho compuesto (Cui et al., 2017a).

Los parámetros de resistencia a la tracción, fuerza máxima necesaria para romper una película sometida a estiramiento, y elongación hasta rotura, valor máximo de estiramiento alcanzado por la película antes de su rotura, también se muestran en la tabla 44. Según Giménez et al. (2009), la adición de hidrolizados peptídicos en películas podría modificar las propiedades mecánicas de las mismas garantizando un efecto plastificante. Sin embargo, la resistencia a la tracción no se vio modificada por la adición en la película del hidrolizado libre ($p>0,05$), por lo que el hidrolizado de colágeno no fue un factor determinante en las propiedades de estas películas. En cambio, sí que disminuyó en presencia de liposomas, aunque únicamente de manera significativa ($p\leq 0,05$) cuando el glicerol se añadió directamente (P-L-HC+G). El grado de elongación fue bastante elevado ($\approx 50\%$), sin diferencias entre películas ($p>0,05$). Estas propiedades proporcionan a las películas una excelente versatilidad para elaborar y/o envasar productos alimentarios. Ebrahimi et al. (2018) obtuvieron una resistencia a la tracción mayor

(14 MPa) y menor elongación a rotura (25 %) en películas de carboximetilcelulosa con glicerol, aunque éstas tenían menor espesor. Sin embargo, Zhu et al. (2018) obtuvieron valores superiores en ambos parámetros para películas de hidroxipropilmetilcelulosa incorporando liposomas a base de fosfolípidos y colesterol. Cui et al. (2017a) obtuvieron valores parecidos para películas de quitosano incorporando glicerol y liposomas de lecitina de soja, con una elongación del 45-55 % y una resistencia a la tracción de 11-13 MPa (N/mm²), demostrando la importancia del biopolímero en las propiedades de la matriz.

Tabla 44. Propiedades mecánicas de las películas, donde P+G: película con glicerol; P+G+HC: película con glicerol e hidrolizado de colágeno; P-L-HC+G: película con glicerol y liposomas rellenos de hidrolizado de colágeno; P-L-HC-G: película con liposomas rellenos de hidrolizado de colágeno y glicerol. Diferentes letras (a, b, c) en la misma Columna indican diferentes significativas ($p \leq 0,05$) entre películas.

| | Adhesividad (mN) | Resistencia a la tracción (N/mm ²) | Elongación hasta rotura (%) |
|----------|---------------------------|---|--------------------------------|
| P+G | 37,8 ± 6,7 ^a | 6,0 ± 0,7 ^b | 51,2 ± 8,6 ^a |
| P+G+HC | 37,6 ± 3,3 ^a | 5,8 ± 0,8 ^b | 53,2 ± 9,3 ^a |
| P-L-HC+G | 429,3 ± 26,4 ^c | 4,2 ± 0,8 ^a | 45,6 ± 7,2 ^a |
| P-L-HC-G | 392,1 ± 25,1 ^b | 5,2 ± 0,6 ^{ab} | 51,0 ± 7,7 ^a |

Efecto de la digestión gastrointestinal *in vitro*

Los péptidos pueden sufrir cambios debidos a su interacción con otros componentes alimentarios durante el procesamiento y después de la ingestión oral por la acción de proteasas digestivas. De igual manera, los liposomas pueden sufrir alteraciones que afecten a la integridad y bioaccesibilidad del bioactivo encapsulado. Por este motivo, las películas se sometieron a una digestión gastrointestinal *in vitro* durante 4 horas, donde las dos primeras horas corresponden a la digestión gástrica y las dos últimas a la digestión intestinal, con el objetivo de conocer el comportamiento de los liposomas después de ser sometidos a una digestión gastrointestinal *in vitro*, en términos de integridad estructural y de actividad funcional.

Las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión por criofijación de las películas digeridas evidenciaron que los liposomas son resistentes a la digestión, sin presentar signos de ruptura (Figura 98).

La morfología y el tamaño medio de las vesículas fueron bastante similares a sus correspondientes sin digerir, aunque con menos eventos de bi- o multilamellaridad. Por otro lado, se observa un considerable número de estructuras multivesiculares.

Las películas P-L-HC+G digeridas presentaron un mayor número de vesículas de gran tamaño respecto a la películas P-L-HC-G digeridas, en las que predominan las vesículas de pequeño tamaño, tanto en forma libre como incluidas en estructuras multivesiculares. Estos resultados indican que el glicerol protege la integridad de las vesículas de forma más efectiva, tanto durante el secado de la película como durante su posterior digestión, cuando se añade previamente durante la formación de la dispersión liposomal.

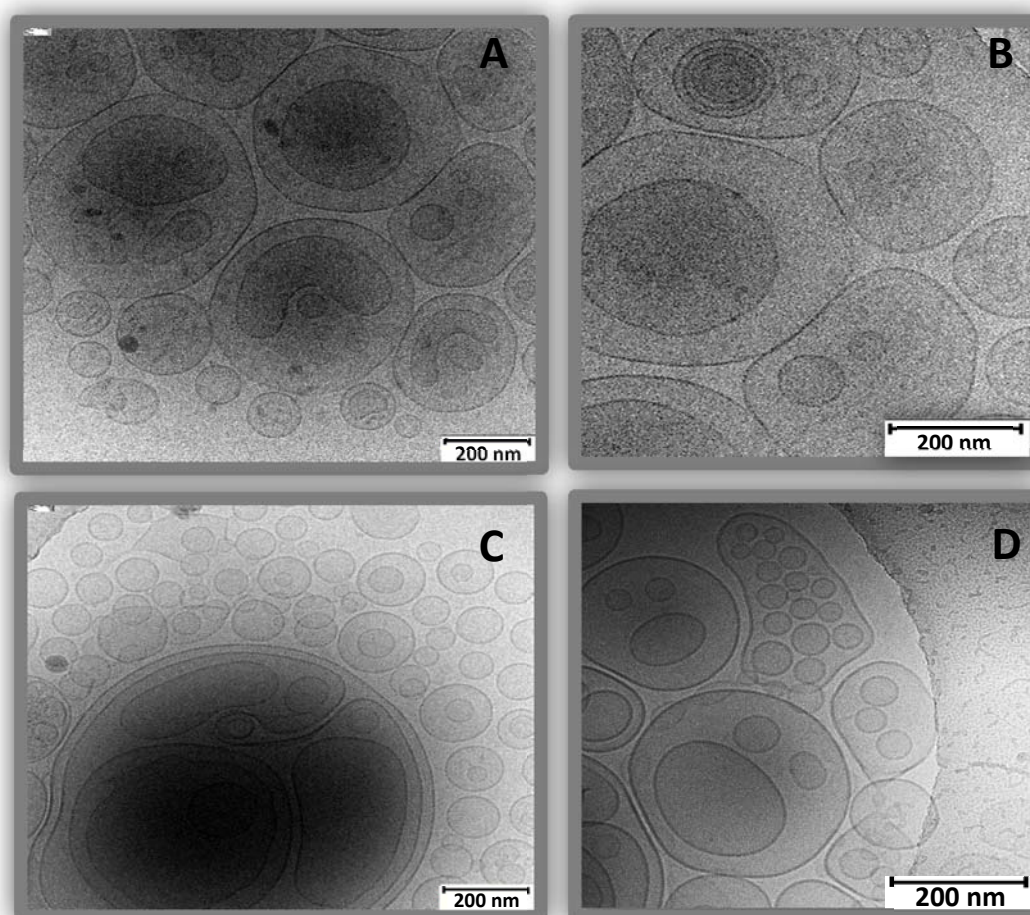


Figura 98. Microscopía electrónica de transmisión por criofijación de películas conteniendo liposomas sometidas a una digestión gastrointestinal *in vitro* (4 h). A y B: películas con glicerol y liposomas rellenos de hidrolizado de colágeno (P-L-HC+G). C y D: películas con liposomas rellenos de hidrolizado de colágeno y glicerol (P-L-HC-G).

Actividad antihipertensiva

La actividad del hidrolizado de colágeno (a una concentración de 0,8 mg/mL) fue del 43,96 % (Tabla 45). Su digestión gastrointestinal *in vitro* indujo un progresivo incremento de actividad hasta las 3 h de digestión, momento a partir del cual disminuye ($p \leq 0,05$). Este incremento se atribuye a que el proceso de digestión ocasiona la hidrólisis del extracto con la formación de péptidos más pequeños de mayor actividad (Aleman et al., 2013), pero existe un límite donde la hidrólisis puede ser excesiva y la actividad disminuya (Gong et al., 2016).

La presencia de glicerol en los liposomas (L-HC-G) no modificó ($p > 0,05$) la actividad comparada con aquéllos que no lo contienen (L-HC). Ambos liposomas tuvieron un mayor potencial antihipertensivo que el propio hidrolizado de colágeno ($p \leq 0,05$), probablemente como consecuencia de la interacción del bioactivo con la membrana liposomal, lo que podría favorecer una configuración peptídica más activa. La digestión gastrointestinal *in vitro* de los liposomas aumentó la actividad de los mismos ($p \leq 0,05$), sin diferencias significativas en función de las horas de digestión. Gong et al. (2016) observaron el mismo efecto en liposomas elaborados a partir de fosfolípidos de soja y colesterol sometidos a digestión *in vitro* durante 2 horas. Estos mismos autores determinaron una mayor actividad antihipertensiva en nanoliposomas que en liposomas, y mayor en éstos que en el hidrolizado libre, concluyendo que los nanoliposomas tuvieron la mayor biodisponibilidad después de ser digeridos, debido en parte al efecto de la pepsina y la pancreatina sobre dicha actividad. Además, se debe tener en cuenta que la

disminución de actividad en los hidrolizados tras 4 h de digestión no se encontró en ninguna dispersión liposomal, corroborando el papel protector de los liposomas.

Tabla 45. Actividad antihipertensiva (expresada como porcentaje de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina) del hidrolizado (HC) y de los liposomas con glicerol (L-HC-G) y sin él (L-HC) antes y después de ser sometidos a una digestión gastrointestinal *in vitro* durante 2 h de digestión gástrica seguida de 2 h de digestión intestinal. Diferentes letras (a, b, c, d) indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las diferentes horas de digestión de una misma muestra; (x, y) entre muestras para un mismo tiempo de digestión.

| Hidrolizado | Inhibición (%) | Liposoma | Inhibición (%) | Liposoma | Inhibición (%) |
|-------------|-----------------------------|----------|-----------------------------|------------|-----------------------------|
| HC | 43,96 ± 0,84 ^{a/x} | L-HC | 49,88 ± 1,42 ^{a/y} | L-HC-G | 51,18 ± 1,29 ^{a/y} |
| HC 1 h | 55,23 ± 0,24 ^{c/x} | L-HC 1 h | 63,03 ± 2,80 ^{b/y} | L-HC-G 1 h | 63,98 ± 2,09 ^{b/y} |
| HC 2 h | 58,56 ± 0,22 ^{d/x} | L-HC 2 h | 64,11 ± 2,48 ^{b/x} | L-HC-G 2 h | 65,15 ± 1,64 ^{b/x} |
| HC 3 h | 60,11 ± 0,99 ^{d/x} | L-HC 3 h | 64,02 ± 2,56 ^{b/x} | L-HC-G 3 h | 63,12 ± 2,28 ^{b/x} |
| HC 4 h | 51,12 ± 0,12 ^{b/x} | L-HC 4 h | 68,90 ± 2,02 ^{b/y} | L-HC-G 4 h | 66,22 ± 0,55 ^{b/y} |

La actividad antihipertensiva de las películas digeridas no pudo ser determinada debido a la fuerte interferencia causada por la carboximetilcelulosa, cuya naturaleza de fibra le hace ser altamente viscosa en solución acuosa. Del mismo modo, cuando se intentó separar la carboximetilcelulosa por centrifugación, no se detectó actividad en el sobrenadante, dado que los liposomas fueron arrastrados junto con la fibra hasta el precipitado.

Existen estudios que demuestran la capacidad de transporte de las matrices de carboximetilcelulosa, liberando el compuesto bioactivo en la fase intestinal de la digestión gastrointestinal *in vitro*, lo que sugiere que son adsorbidos principalmente en el intestino delgado. Feng et al. (2013) observaron que cuando administraban doxorubicina cargada en liposomas, que a su vez fueron incorporados en matrices de quitosano con carboximetilcelulosa, la biodisponibilidad del bioactivo aumentaba con respecto a su forma libre.

Para evaluar correctamente si los liposomas son atrapados por la fibra y el grado en que están disponibles para cruzar el epitelio de membrana, serían necesarios una serie de experimentos que serían objeto de un trabajo diferente. No obstante, se evaluó la integridad de los liposomas en la matriz de la película tras la digestión gastrointestinal *in vitro* mediante visualización por microscopía electrónica de transmisión a temperatura criogénica.

Conclusiones

Las propiedades de partícula (tamaño medio y potencial zeta) de los liposomas no se vieron afectadas ni por la presencia del hidrolizado de colágeno ni por la del glicerol. La presencia de glicerol no interfirió en la capacidad antihipertensiva de los liposomas con HC, siendo ésta más elevada que la del propio hidrolizado de colágeno (dadas las nuevas interacciones en la conformación liposomal) e incrementada durante el proceso de digestión gastrointestinal.

Los liposomas incorporados en películas de carboximetilcelulosa fueron resistentes al proceso de secado de las películas y también al posterior proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*. El aumento de adhesividad en las películas con liposomas podría ser de interés en promover las interacciones con la membrana intestinal y favorecer la absorción liposomal. La inclusión previa del glicerol en liposomas contribuye a estabilizar el tamaño y morfología de las vesículas embebidas en películas de carboximetilcelulosa en mayor medida que si se agrega el glicerol en forma libre a la solución formadora de película. Este efecto fue observado tanto antes como después de que dichas películas fueran sometidas a una digestión gastrointestinal *in vitro*.

9. DISCUSIÓN INTEGRADORA

9.1. Materias primas

9.1.1. Residuos agroalimentarios y pesqueros

Las industrias encargadas del procesamiento de productos alimentarios generan una ingente cantidad de residuos, desechos que son descartados y posteriormente eliminados. Dos de las industrias alimentarias que generan una mayor cantidad de estos residuos son la industria pesquera y de acuicultura y la industria agraria. En el sector pesquero cada vez es más frecuente el deshecho de diversas estructuras que forman parte de la anatomía de los pescados y productos marinos, como pueden ser vísceras, espinas, pieles, escamas, cabezas, cutículas, etc., comercializando los productos ya limpios presentados en diversas preparaciones, con la finalidad de facilitarle al consumidor el manejo y consumo del producto. Esto facilita el acumulo de residuos en las plantas procesadoras y por tanto la potencial gestión de los mismos. En otras ocasiones, no es un residuo propiamente dicho, sino más bien un producto infrautilizado, ya que es el ejemplar entero el que es descartado como consecuencia de su bajo valor comercial o debido a que se excede la cuota máxima de captura de una determinada especie (aunque sea ésta muy apreciada), acorde a la política pesquera europea. Por su parte, el sector agrario genera importantes cantidades de desechos procedentes de partes o componentes de frutos que no son consumidos habitualmente, como pueden ser semillas, pedúnculos o cáscaras (de granada, naranja, etc.). Existen otras fuentes independientes de los descartes que también podrían ser utilizadas para un mejor aprovechamiento y explotación de sus recursos y propiedades, como son las especies vegetales infrautilizadas, bien sea por su escasa utilización, o bien porque tiene una gran producción muy superior a su consumo. En Europa hay extensos y numerosos cultivos de especies como la soja o incluso de especies salvajes como el hinojo marino que, por su desconocimiento o baja demanda, no se utilizan y acaban abandonados o echándose a perder, desaprovechando su posible potencial. Estas especies son consideradas como infrautilizadas.

Los descartes suponen un problema medioambiental ya que necesitan de un procesamiento adicional para ser degradados y eliminados, y muy frecuentemente son arrojados descuidadamente en el entorno natural, provocando su acumulación excesiva y su interacción con animales y plantas, con el posible efecto negativo que ello conlleva. Además, la eliminación de estos desechos, tanto los que llegan a la planta de residuos como los que no, supone un considerable gasto económico. Por estas razones principalmente, en las últimas décadas existe un creciente interés por parte de las industrias y de la sociedad en general en el aprovechamiento de algunos residuos o desechos, así como de algunas especies infrautilizadas, para intentar alcanzar en lo posible un uso integral, con el objetivo de evitar los efectos nocivos en el medioambiente y reducir el coste económico. A su vez, aprovechar las propiedades beneficiosas que los componentes de estos residuos contienen: propiedades funcionales interesantes desde el punto de vista tecnológico y bioactivo que pueden dar lugar a su potencial aplicación en base a diversos aspectos.

9.1.2. Propiedades saludables y/o bioactivas

Otra razón de peso que incentiva el aprovechamiento de los residuos y plantas infrautilizadas es su potencial bioactivo. El hecho de que no hayan sido explotadas hasta hace unos años se debe a la ausencia de industrias encargadas de tal cometido como consecuencia del desconocimiento de las propiedades beneficiosas que puedan tener estos residuos y especies infrautilizadas. Sin embargo, se ha demostrado recientemente que la mayoría de ellos poseen importantes y destacadas actividades biológicas que desencadenan beneficios y propiedades saludables sobre la salud humana, por lo que su aprovechamiento cada vez cobra más importancia.

Los residuos procedentes de componentes del pescado, a pesar de ser descartados, son fuente de compuestos con diferentes propiedades funcionales, tanto tecnológicas como nutracéuticas,

como es el caso de las espinas, escamas y pieles, que constituyen una fuente de colágeno, proteína presente en todos los animales implicada en el fortalecimiento óseo y regeneración tisular, entre otras funciones; o las cutículas de crustáceos, conocidas por su poder antioxidante atribuido a la presencia de carotenoides y compuestos antioxidantes como el tocoferol, por mencionar la parte que se ha utilizado en la presente memoria, pero sin olvidar el papel tan importante que están adquiriendo la quitina y quitosano en los últimos años en el campo de la cosmética y medicina y que también provienen de la cutícula de los crustáceos principalmente. Por otro lado, las especies de bajo valor comercial y aquellas que exceden la cuota de captura, aunque no tengan salida en el mercado para consumo directo, podrían ser sometidas a procesos de transformación industrial mediante la adición de diversos compuestos bioactivos, dando lugar a nuevos productos comerciales de valor añadido, además del aprovechamiento de un recurso proteico que ello conllevaría. Los residuos del sector agrario y especies vegetales infrautilizadas también poseen marcadas propiedades funcionales saludables, siendo una de las más comunes su potencial antioxidante atribuido a su composición rica en polifenoles. En algunos casos, la actividad de algunos componentes desechados llega a ser incluso mayor que la del componente normalmente utilizado. Además, por supuesto, de las propiedades tecnológicas que cada uno de los compuestos pueda conferir según sus características intrínsecas.

9.1.3. Lecitina y fosfatidilcolina

Como ya avanzábamos en el apartado anterior, el cultivo de soja (*Glycine max*) es un claro ejemplo de especie vegetal infrautilizada, dado que sus cultivos se extienden ampliamente por el centro de Europa y otras vastas regiones del mundo sin ser adecuadamente aprovechados. La soja tiene multitud de beneficios sobre la salud, destacando sus efectos a nivel cognitivo, contra diversas enfermedades cardiovasculares y su capacidad de reducir el colesterol. Cuando se trata del ámbito nutricional habitualmente se habla de la semilla de soja, conocida por su alto contenido proteico. A partir de dicha semilla se puede obtener un subproducto resino-aceitoso con importantes propiedades beneficiosas atribuidas a su composición rica en ácidos grasos poliinsaturados, la lecitina de soja. La lecitina es un producto orgánico cuyos componentes están presentes de forma natural en cerebro, hígado, riñones y médula ósea, por lo que su ingesta adicional proporciona un mejor desarrollo y funcionamiento de distintos órganos y estructuras, así como del metabolismo orgánico en general.

El análisis composicional de la lecitina de soja (LS) utilizada en el presente trabajo mostró una proporción de fosfolípidos del 57,55 % del total de lípidos que lo constituyen, donde la mayoría de ellos (52,38 % del total) corresponden a fosfatidilcolina (Figura 99).

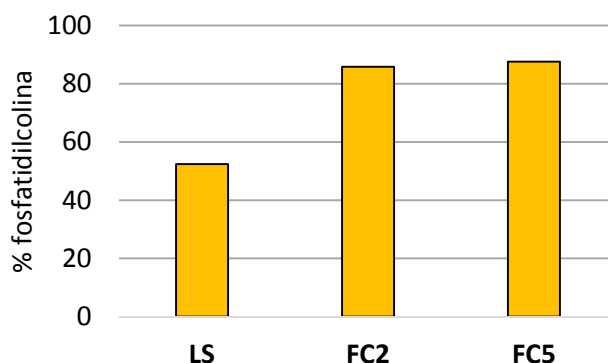


Figura 99. Contenido en fosfatidilcolina, expresada como porcentaje (%), de lecitina de soja (LS) y fosfatidilcolina parcialmente purificada mediante dos (FC2) y cinco lavados (FC5).

El resto de componentes son principalmente lipídicos (lípidos neutros y ácidos grasos libres) con una pequeña presencia de compuestos que pueden considerarse impurezas de la extracción (colesterol, triglicéridos, proteínas, carbohidratos, etc.). Por tanto, la mitad de la composición de la lecitina corresponde a fosfatidilcolina, fosfolípido con cabeza polar de colina con beneficios sobre la salud cognitiva. La composición de ácidos grasos de estos fosfolípidos fue predominantemente insaturada (mono- y poliinsaturada), factor que desencadena efectos beneficiosos en el organismo, como la reducción de colesterol.

Además, la lecitina de soja mostró un muy elevado contenido en tocoferoles (γ -tocoferol, δ -tocoferol y α -tocoferol) (Figura 100), compuesto antioxidante con efectos beneficiosos frente al estrés oxidativo y la proliferación de especies reactivas de oxígeno. En función de estos componentes podemos afirmar que la lecitina de soja es un compuesto orgánico rico en compuestos bioactivos con propiedades muy beneficiosas para la salud.

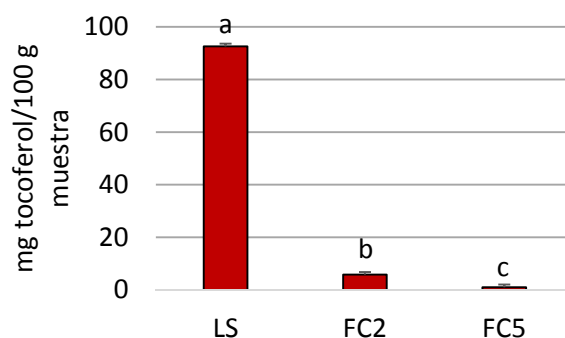


Figura 100. Contenido en tocoferoles totales, expresados como mg/100g, de lecitina de soja (LS) y fosfatidilcolina parcialmente purificada mediante dos (FC2) y cinco lavados (FC5).

Dadas las propiedades saludables de la fosfatidilcolina, se procuró obtener un derivado de la lecitina de soja con la mayor concentración posible en fosfatidilcolina, mediante su purificación con lavados sucesivos en acetona. De este modo, se obtuvieron dos fosfatidilcolinas parcialmente purificadas, mediante dos (FC2) y cinco lavados (FC5). Ambas mostraron una mayor concentración de fosfolípidos totales respecto a la lecitina (94,77 % y 95,74 % para FC2 y FC5, respectivamente) y, también, de fosfatidilcolina (85,82 % y 87,58 % para FC2 y FC5, respectivamente) (Figura 99), manteniendo el elevado grado de ácidos grasos insaturados en esta fracción. Esta composición tan rica en fosfolípidos y fosfatidilcolina aportará presumiblemente mayores beneficios sobre el organismo. Sin embargo, uno de los inconvenientes de estas fosfatidilcolinas parcialmente purificadas es que el lavado con acetona (reconocido como uno de los mejores solventes para concentrar la fosfatidilcolina) es responsable de la eliminación concomitante de otros componentes presentes en la lecitina que pueden ser de interés, fundamentalmente por su capacidad para estabilizar la oxidación de los lípidos presentes. Tal es el caso de los tocoferoles, cuyo contenido se reduce un 93,74 % en FC2 y un 98,87 % en FC5 (Figura 100). Por tanto, estas materias primas derivadas pierden buena parte de su mecanismo antioxidante intrínseco.

Ambas fosfatidilcolinas presentaron una composición fosfolipídica muy interesante desde el punto de vista nutricional, aunque sin grandes diferencias entre ellas, lo que indica que un mayor grado de purificación no mejora sustancialmente la composición lipídica. Por tanto, aunque la fosfatidilcolina de cinco lavados (FC5) fue la que presentó un mayor grado de purificación, para la mayoría de aplicaciones alimentarias la fosfatidilcolina de dos lavados (FC2) podría ser suficiente para obtener una materia prima de excelentes propiedades, sin necesidad de tener que purificar cinco veces (FC5). En cambio, la lecitina de soja (LS), presentó una composición diferente con respecto a sus derivados, caracterizada por una considerable menor proporción

de fosfolípidos (y fosfatidilcolina) pero una concentración de tocoferoles mucho más elevada. Estos resultados sugieren que la lecitina es otra materia prima lipídica con excelentes propiedades que también podría ser utilizada en muchos ámbitos alimentarios, sobre todo aquellos en los que no sea necesario o imprescindible un elevado grado de pureza en fosfolípidos. Presenta la ventaja de poseer un presumible elevado poder antioxidante, importante propiedad en muestras poliinsaturadas susceptibles de sufrir oxidación lipídica (como es el caso), y de no necesitar ningún tratamiento, pudiendo ser empleada sin demoras.

Si se considera la posible utilización, tanto para fines alimentarios como cosméticos o dietéticos, de la fosfatidilcolina extraída en comparación con las comerciales, ésta es notablemente más económica y de un elevado grado de pureza, pudiendo ser realmente competitiva.

9.1.4. Extractos bioactivos

Se obtuvieron diferentes extractos bioactivos procedentes de diversas fuentes naturales: un hidrolizado peptídico de colágeno (HC) procedente de piel y túnicas del manto del calamar gigante (*Dosidicus gigas*), una fracción peptídica <1 kDa (FP1) procedente de langostino (*Penaeus notialis*), un extracto polifenólico (PG) de piel y albedo del fruto de la granada (*Punica granatum*), un extracto polifenólico (HM) de las partes aéreas (tallos y hojas) de la planta de hinojo marino (*Crithmum maritimum*) y un extracto lipídico rico en astaxantina (GC) procedente de residuos (cutículas, cefalotórax, parápodos, pleópodos y telson) de langostino (*Litopenaeus vannamei*).

Todos los extractos bioactivos fueron obtenidos a partir de fuentes naturales (animales o vegetales) que normalmente se consideran desechos (pieles y túnicas del manto de calamar, piel y albedo de granada o residuos de langostino), están infrautilizadas (el hinojo marino), o no tienen valor comercial por una conservación excesivamente prolongada (langostinos de la especie *Penaeus notialis* conservados intencionadamente durante 6 años en congelación). De este modo, se pretende dar un uso integral a las materias primas intentando aproximarse a la filosofía de residuos cero, buscando por tanto un mejor aprovechamiento de sus diferentes partes que se van fraccionando durante el procesamiento y un mayor rendimiento de las mismas. Además, la diversa procedencia de éstas, permite la obtención de potenciales bioactivos de diferente naturaleza: peptídica, polifenólica y caroteno-lipídica.

Este potencial bioactivo se obtiene mediante procesos de extracción con solventes orgánicos o enzimas, los cuales permiten una mayor concentración de sus compuestos de interés en función del solvente y/o enzima utilizado. Así, una mezcla etanol/agua fue empleada para los extractos polifenólicos (PG y HM), acetato de etilo para el extracto lipídico (GC) y las enzimas alcalasa y tripsina pancreática para los extractos peptídicos (HC y FP1, respectivamente). Destacar que HC fue obtenido a partir de la fracción colagenosa soluble en ácido mientras que FP1 a partir de la fracción acuosa del langostino entero hidrolizado.

Caracterización físico-química

Ambos hidrolizados peptídicos, HC y FP1, se presentaron en forma de polvo fino blanquecino de baja humedad, debido a que se sometieron a un proceso de secado por liofilización similar. Sin embargo, dada su distinta procedencia (músculo de langostino y túnica de calamar) presentaron un perfil aminoacídico diferente. Aunque ambos extractos mostraron el mismo orden descendente para los cuatro aminoácidos mayoritarios (glicina, ácido glutámico, alanina y ácido aspártico) y cantidades similares de los tres últimos, el extracto de HC destacó por su mayor contenido en glicina (253 ‰), así como cantidades superiores de hidroxilisina (20 ‰) e hidroxiprolina (44 ‰) respecto al extracto de FP1 (185, 2 y 7 ‰, respectivamente). Estas diferencias se atribuyen a la fuente de la que proceden, ya que el colágeno (HC) es rico en residuos de glicina (Matilla et al., 2002) y los aminoácidos de hidroxilisina e hidroxiprolina se

forman durante la síntesis del colágeno (Cruz et al., 2009). La cantidad de aminoácidos hidrofóbicos, expresada como suma de los presentes, fue muy diferente entre ambos extractos, siendo del 52 % para FP1 y del 28 % para HC. Este bajo valor en el hidrolizado de colágeno fue probablemente consecuencia de su proceso de extracción en ácido acético, pudiendo quedar gran parte de aminoácidos hidrofóbicos en la parte no soluble en ácido descartada.

El perfil de pesos moleculares también fue diferente. Esto, en gran medida, se debe al proceso de filtración: FP1 fue filtrado previo a su análisis por una membrana de 1 kDa, limitando su tamaño máximo a 1000 Da, de ahí que las poblaciones de tamaños encontradas sean de 550 Da y 200 Da para una absorbancia a 214 nm, y de 490 Da, 240 Da y 150 Da para una absorbancia de 280 nm; todas ellas inferiores a 550 Da. Si en esta hidrólisis con la enzima tripsina pancreática hubiera algún fragmento por encima de 1 kDa quedaría eliminado por la membrana utilizada para filtrar. Por el contrario, HC no fue sometido a ningún paso previo de filtración, por lo que su distribución de tamaños es el que presenta tras el proceso de hidrólisis. En principio es más variada y con poblaciones de mayor peso molecular, encontrándose una población minoritaria (11 %) con un tamaño comprendido entre 6500-1355 Da y dos poblaciones mayoritarias con un tamaño de 1355-502 Da (47 %) y <502 Da de (42 %). Por tanto, mientras que el 100 % de las poblaciones de FP1 fueron \approx 500 Da, únicamente el \approx 42 % de las poblaciones de HC lo fueron. Estos resultados indican que los extractos peptídicos fueron diferentes en términos de composición de aminoácidos y peso molecular, como consecuencia de la utilización de materias primas diferentes (músculo de langostino y túnica de calamar), un proceso de obtención con enzimas también diferentes (alcalasa y tripsina), y un paso de filtrado adicional sólo en uno de los hidrolizados.

En cuanto al aspecto de los extractos polifenólicos deshidratados, el extracto etanólico de piel y albedo de granada (PG) presentó un color marrón y una consistencia semejante a la de un caramelo duro, mientras que los extractos de hinojo marino (HM) se presentaron en forma de polvo fino de color verde (HM-etanólico) y marrón (HM-acuoso). La particular textura de PG podría atribuirse a que, a diferencia de los extractos de HM, el extracto de piel de granada es una mezcla compleja y variada de compuestos fenólicos, como mostraron sus perfiles cromatográficos. Estos perfiles reflejaron una variada presencia de polifenoles en PG, siendo su composición en orden decreciente: β -punicalagina, ácido elágico, α -punicalagina, rutina y epigallocatequina. En el espectro se observan otros picos de intensidad intermedia no identificados con ninguno de los patrones y estándares más típicos en este tipo de muestras (epigallocatequina-3-galato, epigallocatequina galato, hiperósido, quercetina, kaempferol-3-O-glucósido, ácido gálico, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido siríngico, ácido rosmarínico, vitamina C). La presencia de unos u otros compuestos puede atribuirse a muchos factores, que al ser residuos de productos comerciales no pueden valorarse, por ejemplo, la época de producción, localidad, clima, etc... Por este motivo no van a ser objeto de discusión, pero sí nos parece importante destacar las grandes diferencias entre éste y otros resultados de la bibliografía, que pueden ser atribuidos bien a las diferencias intrínsecas de la materia prima y sus condiciones ambientales, así como al proceso de obtención del extracto.

En cambio, los extractos de hinojo fueron bastante más sencillos en cuanto a su composición, mostrando el extracto de hinojo etanólico predominancia (58,48 mg/g) de ácido clorogénico (conformado por un enlace éster entre los ácidos hidroxicinámicos cafeico y quínico) y pequeñas cantidades de rutina (4,52 mg/g) y ácido rosmarínico (2,81 mg/g); y el extracto acuoso de hinojo igualmente ácido clorogénico como compuesto fenólico mayoritario (42,61 mg/g) y pequeñas cantidades de vitamina C (1,46 mg/g). Uno de los picos de intensidad intermedia en el extracto acuoso de hinojo marino quedó sin identificar ya que no se encontró ningún patrón de compuesto fenólico a semejante tiempo de retención, a pesar de todos los patrones testados. Estos resultados demuestran la diferente composición de los extractos vegetales estudiados,

con compuestos polifenólicos muy diferentes entre sí como consecuencia de su diferente materia prima de procedencia.

El proceso de ultrasonificación parece mejorar la eficacia de extracción de los compuestos polifenólicos, al menos en el extracto de hinojo marino, obteniéndose una mayor concentración del compuesto fenólico mayoritario (ácido clorogénico) que en el resto de experimentos observados en la bibliografía. Sin embargo, otros tratamientos, como es el caso del calentamiento y sonicación durante el proceso de encapsulación, han evidenciado una ligera disminución de dicho compuesto mayoritario en el extracto, induciendo la degradación y/o transformación de los bioactivos. Por tanto, el procedimiento de extracción y procesamiento de los compuestos bioactivos son factores críticos, pues algunos tratamientos podrían alterar la composición del extracto y como consecuencia disminuir su potencial bioactivo.

Ninguno de los extractos polifenólicos se consideró citotóxico como tal, ya que, salvo la concentración máxima testada (1 mg/mL) en el extracto de piel de granada (PG) que tuvo un valor del 74 % de viabilidad celular, ningún extracto a cualquier concentración ensayada mostró una viabilidad celular inferior al 80 % (Figura 101), indicativo de un bajo efecto citotóxico. Además, la concentración de 1 mg/mL se considera una concentración de extracto bastante elevada. El extracto acuoso de hinojo marino, al estar extraído únicamente en agua, fue el que presentó una menor citotoxicidad (viabilidad celular >90 %) en comparación con los extraídos en etanol (HM-et y PG).

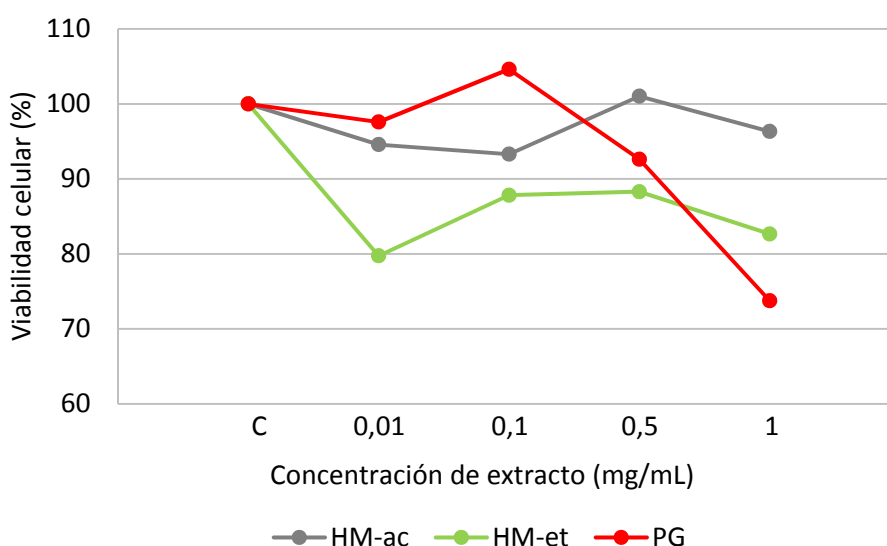


Figura 101. Citotoxicidad, expresada como porcentaje de viabilidad celular, de los extractos polifenólicos (hinojo marino acuoso y etanólico, así como de piel y albedo de granada) a diferentes concentraciones.

El extracto procedente de residuos (cefalotórax, cutículas, parápodos, pleópodos y telson) de langostino (GC) es un extracto lipídico (≈ 80 % ácidos grasos) compuesto por una elevada proporción de ácidos grasos insaturados (69 %), rico en astaxantina (carotenoide típico de crustáceos) y otros componentes como colesterol y α -tocoferol (potente antioxidante). Se presenta como un líquido viscoso de color rojo-anaranjado, atribuido a la presencia de astaxantina, con fuerte olor a crustáceo. Debido a este perfil nutricional puede ser de gran interés como ingrediente alimentario tanto para nutrición animal como humana. En alimentación animal, además de su interés por el perfil de lípidos altamente insaturados, la presencia de carotenoides y fuerte coloración naranja le hace especialmente idóneo para alimentación de salmónidos y aves de corral entre otros. La adición de carotenoides de síntesis en el alimento encarece considerablemente éste, por lo que la recuperación de restos del

procesamiento con este fin podría ser de especial interés. En alimentación humana manifiesta los mismos intereses nutricionales que para el consumo animal, y debido a su composición y su coloración puede tener diversas aplicaciones como ingrediente alimentario. No obstante, su composición grasa limita su aplicabilidad en medio acuoso y su estabilidad oxidativa, por lo que la encapsulación puede ser una estrategia adecuada para solventar ambas limitaciones.

Actividades biológicas

La actividad antioxidante, testada por la técnica de secuestro de radicales libres (ABTS), fue de 69,13 mg ácido ascórbico/g para la fracción peptídica FP1, notablemente superior a la mostrada por el hidrolizado HC (22,36 mg ácido ascórbico/g muestra). Esta mayor actividad antioxidante en la fracción peptídica de langostino podría deberse a su gran cantidad de aminoácidos hidrofóbicos, o al menor peso molecular de los péptidos presentes, que sugiere que en su mayoría son dipéptidos. Además, la posible presencia de astaxantina residual (carotenoide presente en crustáceos) podría contribuir a incrementar dicha actividad antioxidante.

La actividad anti-radicalaria del extracto de PG fue de 360,01 mg ácido ascórbico/g extracto, mientras que la de los extractos de hinojo fue de 556,8 y 805,1 mg ácido ascórbico/g extracto, para los extractos acuoso y etanólico, respectivamente. Estos resultados indican que ambos extractos polifenólicos tuvieron un poder antioxidante notablemente más elevado que cualquiera de los extractos peptídicos, atribuido precisamente a su composición rica en polifenoles (Ismail et al., 2012). Entre extractos polifenólicos, los de hinojo tuvieron una actividad antioxidante superior a los de piel de granada, siendo mayor para el extracto etanólico respecto al acuoso como consecuencia de una mayor concentración de compuestos fenólicos, consecuencia de su extracción con el solvente orgánico etanol. La mayor actividad en los extractos de hinojo respecto al de granada, incluso sin emplear un solvente orgánico (extracto acuoso), podría deberse en parte al proceso de sonicación al que se somete el hinojo durante la extracción, que permite una extracción más eficiente de los compuestos fenólicos antioxidantes.

Sin embargo, para los métodos antioxidantes determinados por el poder reductor del hierro (4622,59 $\mu\text{mol eq Fe}^{2+}$ /g muestra) y el contenido de sustancias reactivas al Folin-Ciocalteu (166,0 mg ácido gálico/g muestra), el extracto de PG mostró una mayor actividad antioxidante que el extracto de hinojo (273,6 y 570,8 $\mu\text{mol eq Fe}^{2+}$ /g muestra en poder reductor del hierro; y 76,0 y 109,0 mg ácido gálico/g muestra en contenido de sustancias reactivas al Folin para los extractos acuoso y etanólico, respectivamente). Estos resultados demuestran que PG fue el extracto polifenólico, y el bioactivo en general (HC presentó 7,11 $\mu\text{mol eq Fe}^{2+}$ /g muestra y 14,89 mg ácido gálico/g muestra), con mayor capacidad reductora.

Ninguna de las técnicas antioxidantes estudiadas dio actividad para el extracto de GC, debido a su naturaleza hidrofóbica y su consecuente insolubilidad en la fase acuosa utilizada para la cuantificación de las actividades. Una de las razones por las que se seleccionó este extracto fue precisamente por su naturaleza fuertemente lipofílica, con el objetivo de comprobar si su encapsulación en liposomas permite o mejora su solubilidad en agua, resultados que veremos más adelante. Sin embargo, el hecho de que no se puedan cuantificar las actividades biológicas por estas técnicas no quiere decir que el extracto no posea poder antioxidante. Dicho poder se vio reflejado con el método de fotoquimioluminiscencia en fase lipofílica (capacidad de secuestro del radical superóxido), obteniéndose un valor de 60,89 mg eq Trolox/g muestra. Por lo tanto, el extracto de grasa de crustáceo tiene un considerable poder antioxidante, siendo muy superior, por ejemplo, al del hidrolizado de colágeno (0,38 mg eq Trolox/g muestra). Esta importante actividad se debe a los compuestos antioxidantes minoritarios presentes en el extracto de GC, como son la astaxantina y el α -tocoferol. También hay que mencionar que el extracto de HC es predominantemente hidrofílico, razón por la cual su cuantificación por

fotoquimioluminiscencia (en fase hidrofóbica) fue tan baja. El extracto de PG, con un valor de 644541,28 mg eq Trolox/g muestra, confirmó su enorme capacidad antioxidante.

Otros autores han cuantificado la actividad antioxidante de sus muestras predominantemente lipofílicas utilizando solventes como etanol, metanol o hexano. Tal es el caso de Sowmya & Sachindra (2012), con valores de 1520 mg ácido ascórbico/g muestra para un aislado de astaxantina procedente de residuos de *Penaeus indicus*, y de Sowmya et al. (2011) con un valor de 1150 mg ácido ascórbico/g muestra para un aislado carotenoide a partir de residuos de *Penaeus monodon*; y, mediante el contenido de sustancias reactivas al Folin, Guerard et al. (2007) obtuvieron un valor de 0,50-0,65 mg ácido gálico/g muestra para un hidrolizado rico en lípidos a partir de descartes de los langostinos *Penaeus braziliensis* y *Penaeus subtilis*.

La actividad antihipertensiva se expresó como porcentaje de inhibición a una concentración determinada o como valores de IC₅₀ (concentración de muestra necesaria para inhibir el 50 % de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina). La fracción peptídica de langostino (FP1) presentó un valor de IC₅₀ de 74 µg/mL, muy similar a los 85 µg/mL obtenidos por Alemán et al. (2013) para una fracción peptídica <1 kDa a partir de colágeno de piel de calamar. Esta notable actividad antihipertensiva en FP1 podría atribuirse en parte a la gran cantidad de aminoácidos hidrofóbicos presentes en la cadena peptídica y también se asocia con la presencia de péptidos pequeños, en especial dipéptidos. Esta actividad antihipertensiva fue considerablemente menor que la obtenida por Alemán et al. (2011a) para el medicamento comercial Enalapril (7,34 µg/mL) por el mismo procedimiento, sin embargo, cabe suponer que la fracción peptídica de langostino no tendría los efectos secundarios que tiene el medicamento. El hidrolizado de colágeno (HC), en cambio, presentó un valor de IC₅₀ de 910 µg/mL, lo que significa que se requiere mayor cantidad de muestra para inhibir el 50 % de la enzima y por tanto su capacidad antihipertensiva es menor. Esta baja actividad, comparada con FP1, se debe probablemente al proceso de extracción en ácido acético del colágeno del que procede HC, hecho que ha dado lugar a un bajo contenido proteico (47 %) y, como consecuencia, a un bajo poder antihipertensivo.

Con respecto a la actividad antihipertensiva del extracto de piel de granada (PG), a una concentración de 0,8 mg/mL provocó una reducción del 25 % de la actividad de la enzima, valores muy por debajo de los observados para HC (43 %) a igual concentración. La actividad antihipertensiva en el caso de los polifenoles, entre ellos flavanoles y procianidinas, se debe a que tienen un efecto inhibitorio sobre la enzima convertidora de angiotensina ya que compiten con el sustrato por los sitios activos de la enzima (Actis-Goretta et al., 2003). Además, el extracto PG posee un 3,8 % de proteína, que podría contribuir a incrementar su actividad. Aun así, la actividad de PG es muy inferior a la de los extractos peptídicos (FP1 y HC). Por otro lado, el extracto de grasa de crustáceo (GC) no permitió la determinación de su actividad antihipertensiva debido nuevamente a su naturaleza lipofílica.

En resumen, aunque todos los extractos estudiados pueden tener diversas propiedades funcionales, cabe destacar las actividades más características o predominantes para cada extracto. De este modo, los extractos peptídicos FP1 y HC destacan por su capacidad antihipertensiva; el extracto de GC por sus propiedades potenciales antioxidantes, así como los beneficios nutricionales asociados a su composición rica en ácidos grasos poliinsaturados; y los extractos polifenólicos de HM y PG por sus excelentes actividades antioxidantes.

9.2. Liposomas

Los liposomas son vesículas esféricas coloidales de tamaño nanométrico conformadas por una o más bicapas de fosfolípidos englobando un núcleo acuoso. Esta conformación le aporta una naturaleza anfipática, es decir, la posibilidad de incorporar en su interior tanto compuestos lipofílicos (en el interior de la bicapa, asociados a las colas hidrocarbonadas hidrofóbicas que la

componen) como compuestos hidrofílicos (en el núcleo acuoso o bien adheridos a la superficie externa de la membrana mediante su unión a las cabezas polares de los fosfolípidos). Esta propiedad junto con su pequeño tamaño y su similitud con las membranas celulares humanas, les permite la posibilidad de funcionar como transportadores de cualquier tipo de sustancia al interior del organismo, de una manera rápida, eficaz y saludable. Por esta razón, los liposomas podrían llegar a ser empleados como un producto funcional de alto valor añadido, hecho facilitado por la actual Política Europea de Nuevos Alimentos, que reconoce como tal los productos basados en micelas y liposomas.

9.2.1. Dispersiones liposomales vacías

En un primer trabajo experimental se estudiaron las propiedades físico-químicas y estructurales de liposomas vacíos elaborados a partir de diferentes materias, todas ellas procedentes de una fuente natural como es la soja, y sometidos a diferentes tratamientos con el objetivo de seleccionar la formulación liposomal con mejores propiedades, y condiciones más adecuadas para la futura incorporación de bioactivos en su interior, a la vez que sea idónea desde el punto de visto de su aplicación como alimento.

Por ello, se diseñaron dispersiones liposomales con tres materias primas encapsulantes diferentes: lecitina de soja (LS), fosfatidilcolina purificada mediante dos lavados (FC2) y fosfatidilcolina purificada mediante cinco lavados (FC5). Al mismo tiempo, las dispersiones se sometieron a distintos tratamientos de sonicación: método A (5 ciclos a 90 % de amplitud ≈ 120 W) y método B (2 ciclos a 20 % de amplitud ≈ 30 W). Una última variante fue la adición o no en la formulación del crioprotector glicerol (ng significa sin glicerol). De este modo, se elaboraron las siguientes dispersiones liposomales frescas en función del material de partida y de las condiciones de fabricación: LLS, L2A, L2B, L5A, L5B, L5Ang, con el objetivo de estandarizar el proceso de elaboración de liposomas.

Los liposomas de lecitina de soja (LLS) presentaron el mayor tamaño de partícula de todas las dispersiones, así como la peor estabilidad en refrigeración, resultados que se confirmaron mediante microscopía electrónica de transmisión por criofijación, donde los liposomas LLS presentaron vesículas de tamaño superior y mayor heterogeneidad de tamaños y morfología respecto a aquellos elaborados con fosfatidilcolinas parcialmente purificadas. Este hecho se atribuye a que la composición de lípidos de la lecitina es más heterogénea con mayor contenido en tocoferol, colesterol, triglicéridos y ácidos grasos libres, que ocupan espacio e incluso pueden romper en parte el orden de la bicapa, siendo probablemente la causa de un tamaño mayor y una mayor polidispersidad. Sin embargo, el potencial Z indica que son bastante estables manteniéndose en un rango entre -44,3 y -37,2 mV.

Analizando las características de partícula, así como las propiedades estructurales de las dispersiones liposomales realizadas a partir de fosfatidilcolina parcialmente purificada conteniendo glicerol, no se observa una tendencia clara en función de la materia prima empleada (con igual método de sonicación) ni en función de las condiciones de sonicación inducidas (con la misma materia prima), mostrando todos ellos vesículas más pequeñas y de mejor estabilidad que las de LLS. Sin embargo, la combinación de los dos parámetros estudiados, en concreto de fosfatidilcolina parcialmente purificada de cinco lavados (FC5) y método de sonicación fuerte y prolongado (A), sí que presentó diferencias significativas respecto al resto de formulaciones. De este modo, los liposomas con FC5 y sonicación A, es decir, L5A y L5Ang, fueron los que presentaron un menor tamaño medio de partícula, con una buena estabilidad de membrana y una excelente estabilidad en refrigeración. La diferencia entre estas dos dispersiones se basa en la presencia de glicerol en L5A y su ausencia en L5Ang, cuyo efecto se vio reflejado en las propiedades estructurales de los liposomas. El glicerol, aunque no modifica las características de partícula de las vesículas, reemplaza las moléculas de agua de la membrana lipídica aumentando la fluidificación de la misma e incrementando el estado de hidratación de

la membrana. Este fenómeno aumenta el espacio de separación entre las membranas disminuyendo el estrés de ésta y favoreciendo su mejor estabilidad estructural. Además, podría favorecer otros movimientos intrínsecos de la propia membrana (Figura 102).

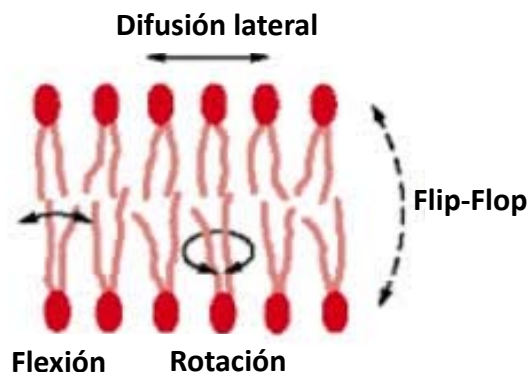


Figura 102. Posibles movimientos de los fosfolípidos dentro de una bicapa lipídica.

En conclusión, podemos afirmar que un solo factor no es suficiente para determinar las propiedades de los liposomas, sin embargo, la combinación de varios de ellos sí lo es. De este modo, los liposomas elaborados con fosfatidilcolina parcialmente purificada de cinco lavados (FC5), método de sonicación fuerte y prolongado (método A) y presencia de glicerol (L5A), fueron los que presentaron mejores características de partícula y propiedades físico-químicas y estructurales, siendo elegida L5A como la formulación liposomal más adecuada.

Esto no significa que el resto de formulaciones liposomales sean defectuosas, sino que no fueron las de mejores propiedades en función de nuestros requerimientos para dispersiones liposomales. Todas ellas tuvieron aceptables propiedades de partícula y físicas, pudiendo ser empleadas como formulaciones alternativas para otras finalidades. Por ejemplo, los liposomas de lecitina de soja (LLS) podrían aplicarse cuando el tamaño medio no sea un factor excluyente o cuando haga falta su aplicación inmediata. Estos liposomas tienen buenas propiedades de partícula y pueden ser utilizados en el acto, sin la necesidad de purificar la materia prima encapsulante. En cambio, si lo que se busca es únicamente un tamaño de vesícula menor, los liposomas con fosfatidilcolina de dos lavados y/o método de sonicación B podrían ser adecuados, de hecho, las dispersiones liposomales elaboradas con fosfatidilcolina de 2 lavados son relativamente próximas en propiedades y pueden presentar ciertas ventajas, como por ejemplo su mayor contenido en tocoferol. Finalmente, si lo que se pretende es, como en este caso, la utilización de liposomas de pequeño tamaño y además una excelente estabilidad estructural habría que remitirse a los liposomas L5A. Por tanto, a partir de este momento, todos los liposomas que se elaboren se harán basándose en la formulación L5A.

9.2.2. Dispersiones liposomales rellenas

Los extractos obtenidos en esta Memoria son concentrados de compuestos bioactivos de diferente naturaleza con importantes propiedades funcionales que pueden aportar beneficios sobre la salud. Sin embargo, estos compuestos bioactivos quedan muy expuestos y por tanto son susceptibles de degradación y/o interacción con la matriz del alimento, tanto durante el procesado como por los procesos de digestión gastrointestinal, donde las enzimas gástricas y el bajo pH pueden degradar dichos bioactivos antes de que puedan ser absorbidos y aprovechados por el organismo. Por esta razón, es conveniente su encapsulación en vesículas, como por ejemplo liposomas, las cuales protegen al extracto bioactivo en su interior frente al deterioro y la degradación, manteniendo inalterables sus propiedades potenciales. Además, en este caso la cápsula, por su perfil rico en lípidos insaturados, constituye un aporte nutricional de interés.

La encapsulación en liposomas de los extractos bioactivos permite que se establezca un beneficio recíproco entre cápsula y bioactivo, pues al incorporar los extractos en liposomas no solo conseguimos el beneficio de la cápsula sobre el extracto, que es proteger al mismo de su degradación para que sus funciones potenciales puedan ser aprovechadas por el organismo, sino que además se obtiene el beneficio del extracto sobre la cápsula, que es el de interactuar con ella pudiendo mejorar su estabilidad y propiedades estructurales o conformacionales. Además, los bioactivos aportan nuevas propiedades funcionales al sistema liposomal adicionales a las de la cápsula, permitiendo la obtención de un producto basado en liposomas con un alto valor añadido en el sector de la alimentación.

Todos los bioactivos seleccionados poseen notables propiedades antioxidantes, las cuales ejercen en parte su acción sobre la cápsula, protegiendo así a los liposomas de la oxidación lipídica. Este era uno de los inconvenientes planteados al estudiar la composición de las materias primas encapsulantes, su posible oxidación derivada de su composición estrictamente lipídica y altamente insaturada, siendo las fosfatidilcolinas parcialmente purificadas las más susceptibles de oxidación. Este problema se subsana en gran medida si se incorporan extractos bioactivos con elevado poder antioxidante (como los seleccionados) en liposomas de fosfatidilcolina.

De este modo, se elaboraron liposomas L5A (FC5, sonicación A y presencia de glicerol) incorporando los diferentes extractos bioactivos estudiados, obteniéndose las siguientes dispersiones liposomales rellenas: L-FP1 (liposoma con fracción peptídica <1 kDa de langostino), L-HC (liposoma con hidrolizado de colágeno), L-PG (liposoma con extracto de piel de granada), L-GC (liposoma con extracto de grasa de crustáceo) y L-HM (L-HM-acuoso y L-HM-etanólico) (liposomas con extractos acuoso y etanólico de hinojo marino), de las que se estudiaron sus características de partícula y propiedades físico-estructurales. Hay que mencionar que todas las formulaciones se prepararon de igual modo, con la salvedad de la concentración de bioactivo, que fue, con respecto a la fosfatidilcolina, del 4 % en L-HC, L-PG y L-GC; del 10 % en L-FP1; y del 8, 16, 32 y 64 % en L-HM, tanto para el extracto acuoso como para el etanólico, que junto con los liposomas vacíos utilizados como control (L-V) constituyen las 13 formulaciones liposomales ensayadas en la presente Memoria. Este estudio integrado nos permitirá, además de comparar entre extractos bioactivos en función de su naturaleza y composición, determinar la importancia de la concentración de bioactivo en las características y propiedades de los liposomas.

Las características de partícula (tamaño medio, índice de polidispersidad y potencial zeta) de todas las dispersiones ensayadas se muestran en la tabla 46. Las dispersiones sin bioactivo encapsulado (L-V) mostraron el menor tamaño medio ($p \leq 0,05$) de vesículas en comparación con cualquiera de las dispersiones rellenas, excepto L-HM-ac 8 ($p > 0,05$), es decir L-HM-ac relleno al 8 %. Este menor tamaño en L-V fue consecuencia de la ausencia de bioactivo en la preparación liposomal, el cual puede ocupar espacio tanto en la bicapa como en el núcleo, induciendo la expansión de los liposomas y el incremento en el tamaño medio de los mismos (Sebaaly et al., 2015).

Entre dispersiones con bioactivos incorporados se observan notables diferencias, oscilando los tamaños entre 89,5-150,0 nm. Para bajas concentraciones de bioactivo (hasta un 16 %) no existe una relación proporcional entre este parámetro y el tamaño medio de los liposomas, pues dispersiones con una menor concentración de bioactivo poseen tamaños tanto mayores como menores que dispersiones con mayor concentración. Por ejemplo, las dispersiones con HC, PG y GC (4 % bioactivo) tienen un tamaño mayor ($p \leq 0,05$) que las dispersiones con HM-et con 8 % de bioactivo y con HM-ac con 16 % de bioactivo. Por tanto, la concentración de bioactivo (hasta un 16 %) no es un factor determinante en el diámetro medio de las vesículas liposomales. En cambio, la naturaleza y composición específica de cada extracto bioactivo es la que determina su eficacia de encapsulación y su localización en los distintos compartimentos de los liposomas y, como consecuencia, un mayor o menor empaquetamiento del bioactivo y tamaño medio. De

este modo, un primer grupo de dispersiones con un tamaño medio menor comprendido entre 89,5-99,9 nm fueron las correspondientes a L-HC, L-PG y L-GC (4 %), L-FP1 (10 %), L-HM-ac (8 % y 16 %) y L-HM-et (8 % y 16 %).

Tabla 46. Características de partícula (tamaño medio, índice de polidispersidad y potencial zeta) de dispersiones liposomales. El número adyacente a cada liposoma indica su concentración de bioactivo en porcentaje (%) respecto a la fosfatidilcolina. Diferentes letras (a, b, c, d, e, f, g, h) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre liposomas.

| Muestra | % de bioactivo | Tamaño (nm) | Polidispersidad | Potencial zeta (mV) |
|---------|----------------|----------------------|---------------------------|-----------------------|
| L-V | - | $87,4 \pm 0,8^a$ | $0,240 \pm 0,005^{ab}$ | $-35,5 \pm 1,7^{cde}$ |
| L-HC | 4 | $102,3 \pm 0,8^{cd}$ | $0,247 \pm 0,019^{abc}$ | $-43,4 \pm 0,7^b$ |
| L-PG | 4 | $104,2 \pm 0,8^d$ | $0,263 \pm 0,017^{bcd}$ | $-38,2 \pm 0,7^{bcd}$ |
| L-GC | 4 | $102,2 \pm 1,6^{cd}$ | $0,246 \pm 0,017^{abc}$ | $-41,9 \pm 2,2^{bc}$ |
| L-FP1 | 10 | $99,9 \pm 4,0^{bc}$ | $0,186 \pm 0,006^a$ | $-53,9 \pm 2,9^a$ |
| L-HM-ac | 8 | $89,5 \pm 0,9^a$ | $0,316 \pm 0,025^{cdef}$ | $-31,8 \pm 1,9^{de}$ |
| L-HM-ac | 16 | $97,3 \pm 0,9^b$ | $0,329 \pm 0,039^{def}$ | $-32,4 \pm 3,7^{de}$ |
| L-HM-ac | 32 | $111,2 \pm 0,8^e$ | $0,345 \pm 0,042^{ef}$ | $-36,7 \pm 6,4^{bcd}$ |
| L-HM-ac | 64 | $137,1 \pm 0,7^g$ | $0,370 \pm 0,018^f$ | $-27,7 \pm 2,8^e$ |
| L-HM-et | 8 | $96,3 \pm 1,3^b$ | $0,309 \pm 0,027^{bcdef}$ | $-34,4 \pm 1,1^{cde}$ |
| L-HM-et | 16 | $106,0 \pm 1,3^d$ | $0,305 \pm 0,017^{bcdef}$ | $-33,0 \pm 3,2^{de}$ |
| L-HM-et | 32 | $127,8 \pm 0,2^f$ | $0,295 \pm 0,018^{bcde}$ | $-33,1 \pm 3,2^{de}$ |
| L-HM-et | 64 | $150,1 \pm 2,0^h$ | $0,324 \pm 0,044^{def}$ | $-30,1 \pm 2,1^{de}$ |

Por otro lado, concentraciones de bioactivo iguales o superiores al 32 % son determinantes en el tamaño medio de las vesículas, estableciendo una proporcionalidad directa (Figura 103).

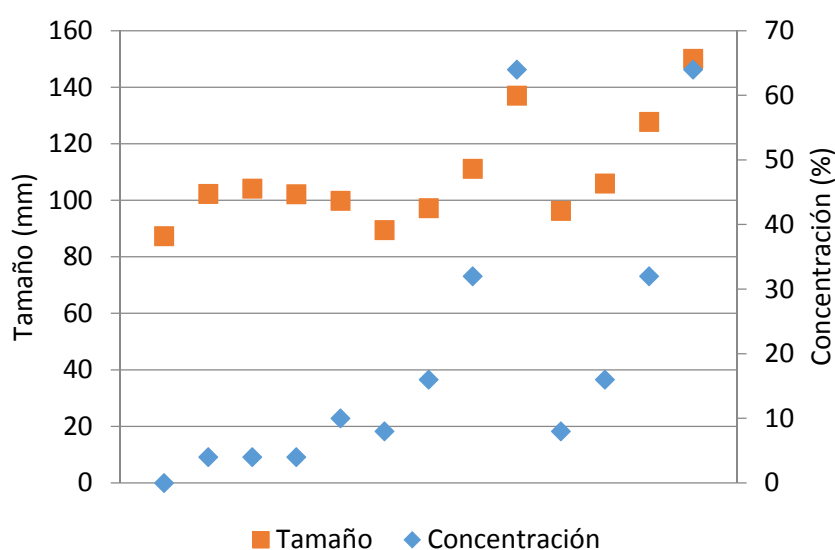


Figura 103. Relación entre la concentración de bioactivo (%) y el tamaño (nm) de las dispersiones liposomales rellenas.

Así, las dispersiones de hinojo marino (L-HM) con 32 % de bioactivo tuvieron un tamaño menor ($p \leq 0,05$) que las dispersiones con 64 % de bioactivo, tanto para los liposomas acuosos como para los etanólicos. Estos resultados indican que una concentración de bioactivo ≥ 32 % es suficiente cantidad para influir en el tamaño medio de las dispersiones liposomales. Además, el tipo de extracto bioactivo sigue siendo importante en el tamaño, pues aquellas dispersiones con extractos etanólicos presentaron un tamaño mayor ($p \leq 0,05$) que las dispersiones con extractos acuosos, a igual concentración de bioactivo.

El índice de polidispersidad sí parece tener relación directa con la concentración de bioactivo (Figura 104), dado que todas las dispersiones con hinojo marino (L-HM) tuvieron un mayor valor (0,295-0,370) que las dispersiones con otros compuestos bioactivos (0,186-0,263), probablemente debido a sus mayores concentraciones de bioactivo. Sin embargo, la excepción fue L-FP1 que presentó un significativo ($p \leq 0,05$) menor índice de polidispersidad que el resto de dispersiones, incluida la dispersión sin extracto (L-V) correspondiente. Otro aspecto a resaltar es que una concentración del 4 % de bioactivo no afecta ($p > 0,05$) al valor de polidispersidad con respecto a las dispersiones sin extracto. Hay que destacar que todas las preparaciones mostraron una distribución de tamaños predominantemente monomodal.

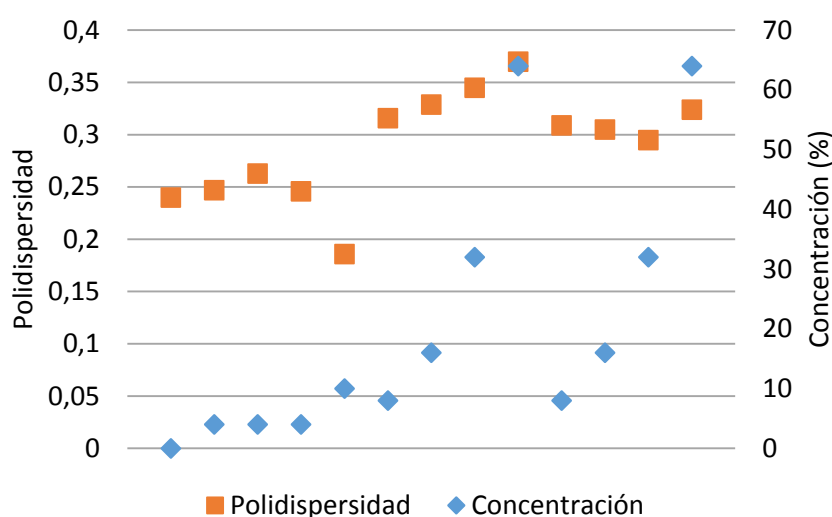


Figura 104. Relación entre la concentración de bioactivo (%) y el índice de polidispersidad de las dispersiones liposomales rellenas.

El potencial zeta, que refleja el potencial y estabilidad de la membrana lipídica, depende también tanto del tipo de extracto encapsulado como de su concentración en los liposomas. Por un lado, influye la concentración de bioactivo, dado que las dispersiones con 4 % de bioactivo (L-HC, L-PG y L-GC) presentaron un potencial zeta más electronegativo que las dispersiones de hinojo con 8, 16 y 32 % de bioactivo (sin diferencias entre ellos), y éstas a su vez más electronegativo que las dispersiones de hinojo con 64 % de bioactivo. Estos resultados sugieren que cuanto mayor es la concentración de bioactivo menos electronegativo es el potencial de membrana, posiblemente como consecuencia de la interacción de la fracción hidrofílica del extracto localizado en la superficie de membrana con la misma. Esta parte del extracto es capaz de contrarrestar la carga negativa de la membrana, siendo el cambio más acusado a mayor concentración de bioactivo. Por otro lado, también influye el tipo de extracto, puesto que las dispersiones vacías (L-V) presentan un potencial intermedio y las dispersiones con la fracción peptídica de langostino (L-FP1) mostraron el potencial más electronegativo con un 10 % de bioactivo, sugiriendo que la composición del bioactivo también tiene influencia en el potencial zeta.

Estos resultados indican que la presencia del bioactivo, así como su concentración creciente, pueden afectar a la estabilidad de membrana de los liposomas como consecuencia de su localización e interferencia con la bicapa lipídica, razón por la que disminuye su electronegatividad y con ello su estabilidad. Sin embargo, todos los valores obtenidos fueron inferiores a -30 mV (a excepción de L-HM-ac 64, con un potencial de -27,7 mV), valor que se define como límite de estabilidad para dispersiones liposomales. Por tanto, podemos garantizar que todas las dispersiones ensayadas fueron muy estables. El análisis multivariante de todos los parámetros estudiados hasta el momento (concentración, tamaño, polidispersidad y potencial zeta) en las dispersiones rellenas determinó que únicamente existe una correlación significativa, positiva, entre concentración y tamaño (0,92), de modo que a mayor concentración de bioactivo mayor será el tamaño de los liposomas.

Todas las dispersiones liposomales analizadas por microscopía electrónica de transmisión, ya sea por el método convencional (L-FP1) o por criofijación (L-V, L-HC, L-PG y L-GC), mostraron predominancia de vesículas unilamelares pequeñas de morfología esférica y distribución de tamaños homogénea, acorde a los resultados de tamaños medios e índices de polidispersidad observados por dispersión dinámica de luz, sin diferencias aparentes entre las diversas dispersiones liposomales. En algunas dispersiones se aprecian algunas estructuras bivesiculares o fenómenos de invaginación (Figura 105).

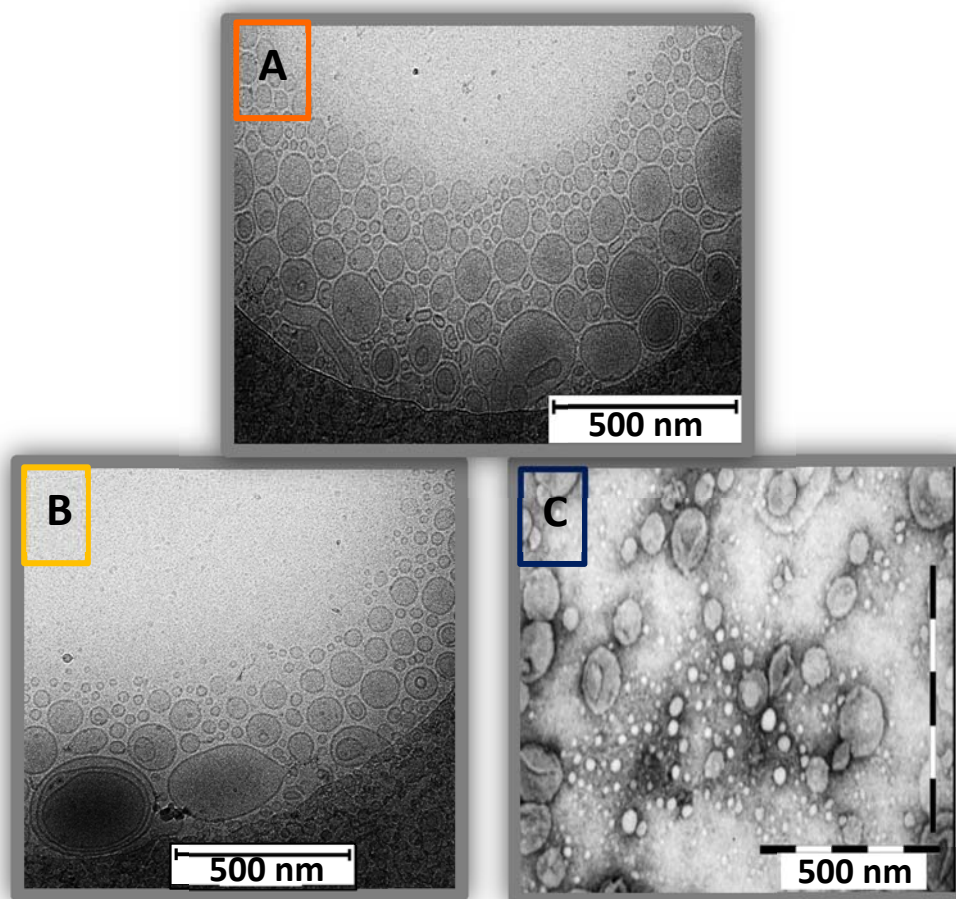


Figura 105. Microscopía electrónica de transmisión de dispersiones liposomales vacías y rellenas con extractos bioactivos. A) Dispersión con grasa de crustáceo (L-GC). B) Dispersión vacía (L-V). C) Dispersión con fracción peptídica <1 kDa de langostino (L-FP1).

Las dispersiones con la fracción peptídica de langostino (L-FP1; C) reflejaron parte del material peptídico fuera de las vesículas, interaccionando con las cabezas polares de los fosfolípidos de

membrana y formando una red proteica. Este material peptídico podría corresponder a parte de extracto no encapsulado (47,6 % la fracción no encapsulada) o bien a extracto adosado a la superficie externa de la membrana, cuyas moléculas asoman al exterior de las vesículas permitiendo la formación de esta red.

La eficacia de encapsulación determina cuantitativamente la cantidad de extracto bioactivo encapsulada en los liposomas, ya sea en el núcleo acuoso, en la bicapa lipídica o adheridos a la superficie externa de la membrana de las vesículas, cuya localización dependerá de la naturaleza y composición del extracto bioactivo. De tal forma, los compuestos hidrofóbicos se situarán en la bicapa lipídica asociados a las colas hidrocarbonadas hidrofóbicas de los fosfolípidos que la componen, mientras que los compuestos hidrofílicos se localizarán en el núcleo acuoso o bien adheridos a la superficie externa de la bicapa, hacia la que se encuentran orientadas las cabezas polares hidrófilas de los fosfolípidos. Igualmente, la eficacia de encapsulación depende de diversos factores y condiciones, aunque el factor determinante en este caso parece ser la composición del extracto bioactivo.

Los liposomas conteniendo el hidrolizado de colágeno (L-HC) presentaron una elevada eficacia de encapsulación del 82,9 % (Tabla 47), valor muy superior al 52,4 % ($p \leq 0,05$) obtenido para los liposomas encapsulando la fracción peptídica <1 kDa (L-FP1), a pesar de constituir ambos extractos peptídicos. Esta gran diferencia se atribuye principalmente a la diferente composición de los bioactivos y a la cantidad de extracto adicionada inicialmente en el proceso de elaboración de los liposomas, pues mientras HC se añadió a una concentración del 4 % (respecto a la fosfatidilcolina) permitiendo una excelente capacidad de encapsulación, FP1 se adicionó al 10 % (también respecto a la fosfatidilcolina), dificultando así la encapsulación, debido probablemente a que quizá suponga un exceso de extracto incorporado. Además, las dispersiones liposomales conteniendo el hidrolizado de colágeno sin glicerol mostraron una eficacia del 80,0 %, reflejando que la presencia de glicerol no influye en la tasa de encapsulación del bioactivo.

Tabla 47. Eficacia de encapsulación de las dispersiones liposomales. El número adyacente a cada liposoma indica su concentración de bioactivo en porcentaje (%) respecto a la fosfatidilcolina. Diferentes letras (a, b, c) indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre dispersiones liposomales.

| Muestra | % de bioactivo | Eficacia de encapsulación (%) |
|---------|----------------|-------------------------------|
| L-HC | 4 | $82,9 \pm 0,1^c$ |
| L-PG | 4 | $54,1 \pm 1,3^a$ |
| L-GC | 4 | $81,0 \pm 0,1^c$ |
| L-HM-ac | 64 | $67,0 \pm 1,5^b$ |
| L-FP1 | 10 | $52,4 \pm 2,4^a$ |

Por otro lado, los liposomas con piel de granada (L-PG) también mostraron una eficacia de encapsulación relativamente baja (54,1 %), en este caso debido a la propia naturaleza polifenólica del extracto, donde la compleja y variada mezcla de polifenoles detectados dificulta su correcta encapsulación (concentración de extracto del 4 %). Estos resultados podrían ser confirmados por la mayor eficacia de encapsulación ($p \leq 0,05$) de los liposomas con hinojo marino (67,0 %) respecto a los de piel de granada, donde un extracto polifenólico de composición no tan compleja se encapsula más eficientemente en liposomas. Sin embargo, la mayor encapsulación en L-HM frente a L-PG también podría deberse a la gran diferencia de concentración de bioactivo entre ambas dispersiones (4 % en L-PG respecto a 64 % en L-HM).

En cambio, los liposomas con grasa de crustáceo (L-GC), también al 4 % de concentración, presentaron una eficacia del 81,0 % (similar a L-HC, $p>0,05$), atribuida al fuerte carácter lipofílico del extracto, lo que facilita su unión a la bicapa lipídica. Estos resultados indican que la eficacia de encapsulación de las dispersiones liposomales depende claramente del extracto bioactivo encapsulado y podría depender en parte de la concentración, en especial cuando ésta es elevada (aunque harían falta más estudios para confirmarlo), pero no de la presencia o ausencia de glicerol. El análisis multivariante de los parámetros anteriores, incluyendo la eficacia de encapsulación de las dispersiones rellenas, demostró que tanto tamaño como potencial zeta están inversamente correlacionados con la eficacia de encapsulación, con coeficientes de correlación de -0,72 y -0,86, respectivamente. De este modo, a mayor tamaño y potencial más electronegativo, menor será la eficacia de encapsulación.

En función de los resultados obtenidos, se seleccionaron tres dispersiones liposomales (L-HC, L-PG y L-GC), junto con las dispersiones control vacías (L-V), para el estudio de su estabilidad en el tiempo conservados durante 2 semanas en refrigeración (4 °C). Todas las muestras reflejaron una excelente estabilidad de partícula durante las dos semanas de conservación, sin cambios significativos ($p>0,05$) en el tamaño medio ni en el índice de polidispersidad, y con ligeras modificaciones en el potencial zeta, únicamente para las dispersiones L-HC y L-GC, que al igual que el resto de dispersiones mantuvieron su potencial de membrana más electronegativo de -30 mV, confirmando una alta estabilidad.

Como hemos visto, factores como la composición-naturaleza del extracto bioactivo y la concentración adicionada del mismo para su elaboración son determinantes en las características de partícula y propiedades físico-estructurales de las dispersiones liposomales rellenas. Independientemente de dichos factores, todas las dispersiones estudiadas presentaron excelentes características de vesícula, con una eficacia de encapsulación relativamente alta, morfología adecuada, diámetro medio y distribución de tamaños aceptables, elevada estabilidad de membrana, así como una excelente estabilidad en el tiempo de los liposomas conservados en refrigeración. Por tanto, estas dispersiones rellenas tendrían propiedades idóneas para ser utilizadas como productos o ingredientes alimentarios.

9.3. Estabilización de liposomas

Las dispersiones liposomales frescas fueron estables en el tiempo durante al menos 2 semanas, tal y como se ha demostrado, pudiendo llegar incluso a serlo durante aproximadamente un mes, según la bibliografía. Sin embargo, tiempos más prolongados de conservación podrían inducir efectos negativos sobre las dispersiones, tales como fusión, agregación o sedimentación de vesículas, así como la liberación parcial o total de los bioactivos encapsulados. Por ello, existen diferentes estrategias tecnológicas para mejorar la estabilidad de los liposomas, permitiendo alargar su vida útil.

9.3.1. Liposomas vacíos

Altas presiones

Los tratamientos de altas presiones hidrostáticas, también conocidos como pascalización o presurización, son una tecnología de gran interés en la industria de los alimentos, especialmente utilizada para la conservación de los mismos, ya que a grandes rasgos merece la pena destacar que elimina gran parte de los microorganismos, incluso virus, sin alterar los micronutrientes, por lo que los compuestos bioactivos pueden permanecer sin alterar. Esta tecnología se basa en una pasteurización en frío, es decir, someter al alimento, previamente envasado en un recipiente hermético, flexible y resistente al agua, a un alto nivel de presión hidrostática e isostática.

Los liposomas sometidos a un tratamiento de alta presión hidrostática (600 MPa a 20 °C durante 20 minutos) no mostraron diferencias ($p > 0,05$) en las propiedades de partícula respecto a los liposomas sin tratar (frescos), con un tamaño medio de ≈ 141 nm, un índice de polidispersidad $\approx 0,23$ y un potencial de membrana ≈ -45 mV. Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión por criofijación confirmaron los resultados obtenidos por dispersión dinámica de luz, presentando ambas dispersiones una distribución de tamaños homogénea similar con vesículas de morfología esférica (Figura 62; capítulo 3). Igualmente, ambas preparaciones presentaron el mismo contenido en agua e idéntica capacidad de dispersabilidad en agua. Estos resultados sugieren que los liposomas podrían ser estabilizados desde un punto de vista microbiológico con un tratamiento de alta presión hidrostática, sin modificar las características de partícula o propiedades físicas de los liposomas.

Congelación

El tratamiento de congelación es otro de los métodos más empleados para la estabilización de vesículas. Los liposomas se congelaron a -20 °C durante 24 horas y posteriormente se descongelaron a temperatura ambiente, procediendo a caracterizar las propiedades de partícula. En estas preparaciones se hace necesaria la inclusión de un compuesto crioprotector en la formulación liposomal que proteja a los liposomas de los posibles efectos adversos inducidos por el propio proceso de congelación, como podrían ser fusión y agregación de las vesículas o la formación de cristales hielo, con la consecuente expansión de los liposomas y daño en las membranas lipídicas. En este caso, como crioprotector se incorporó el glicerol, un polialcohol reconocido por mejorar la estabilidad de las vesículas mediante su protección frente al proceso de congelación, entre otros beneficios.

Tal y como se preveía, los liposomas congelados-descongelados sin glicerol mostraron daño en su estructura liposomal, reflejado por un importante incremento del tamaño medio (258,9 %) y del índice de polidispersidad (142,2 %) ($p \leq 0,05$) respecto al liposoma control (F), así como una disminución del potencial electronegativo (11,6 %), lo que demuestra que el proceso de congelación induce una expansión excesiva de las vesículas, dando lugar a una población heterogénea de tamaños (pasando a tener una distribución bimodal), y disminuye la estabilidad de las mismas, sin afectar al contenido en agua ni a la capacidad de dispersabilidad en agua. Por otro lado, los liposomas congelados-descongelados con glicerol presentaron propiedades de partícula parecidas (tamaño medio, polidispersidad y potencial zeta) a las observadas en los liposomas control sin tratamiento, lo que confirma la acción crioprotectora del glicerol sobre los liposomas y la importancia de su inclusión cuando éstos son sometidos a congelación. Park & Huang (1992) demostraron el efecto crioprotector ejercido por glicolípidos sintéticos sobre la membrana de liposomas cuando éstos fueron sometidos a un tratamiento de congelación, reflejando la capacidad de estabilización de liposomas congelados por parte de los lípidos sintéticos. El hecho de trabajar con un material constituido por lípidos insaturados (no sintéticos) de diversos tipos de cadena origina que los liposomas sean más heterogéneos y por tanto más laxos y flexibles (Hoogevest & Wendel, 2014).

Mientras que la presencia de glicerol no modificó el contenido en agua de los liposomas, sí que disminuyó ligeramente (7 %) la dispersabilidad en agua de los mismos. Esta reducción podría deberse a la elevada densidad del glicerol (1,26 g/cm³).

Posteriormente, se desarrolló otra formulación sometida a congelación-descongelación incorporando el lioprotector trealosa, disacárido formado por la unión de dos glucosas y más reconocido por su protección frente a los daños ocasionados por la liofilización que frente a los de la congelación. Estos liposomas mantuvieron estable el potencial de membrana de las vesículas, aunque aumentaron su tamaño medio (55,5 %) y el índice de polidispersidad (23,1 %) con respecto a los liposomas frescos sin tratamiento, demostrando que no son el mejor

compuesto para actuar como crioprotector de liposomas. Sin embargo, bien es cierto que presentaron mejores propiedades de partícula que aquellos liposomas congelados-descongelados sin crioprotector, lo que sugiere que ejerce algún tipo de efecto de protección. No mostraron diferencias significativas ($p>0,05$) en el contenido en agua y dispersabilidad en agua con los frescos. Por tanto, si los liposomas van a ser sometidos a congelación y después descongelados, mejor utilizar glicerol y, en su defecto, trealosa.

Liofilización

Uno de los métodos de estabilización de dispersiones liposomales posiblemente más utilizados es el secado por liofilización. Este tratamiento consiste en someter a los liposomas, previamente congelados (en el presente trabajo se sometieron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante al menos 24 horas), a un proceso de secado a temperaturas de congelación (a presión reducida de 100 mtorr) con el objetivo de eliminar el agua contenida en la dispersión liposomal por sublimación, con el fin de mejorar su estabilidad y preservación en el tiempo, con el consecuente incremento de vida útil (Stark et al., 2010). La temperatura de congelación fue tan baja ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) para asegurar que no se produjera el colapso de la muestra por transiciones de fase inadecuadas durante el secado. Esto es debido a que la fosfatidilcolina empleada en la preparación de los liposomas era parcialmente purificada a partir de la lecitina de soja, y por tanto, con alto contenido en ácidos grasos insaturados, que, a diferencia de los fosfolípidos sintéticos, tienden a reducir de forma drástica las temperaturas de transición de fase. Esto se evidencia en los resultados de Calorimetría Diferencial de Barrido (Figura 45; capítulo 2). Estos resultados reflejan la temperatura de transición media de los liposomas en torno a los $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, en contraposición a liposomas preparados con fosfatidilcolina sintética, donde esta temperatura ronda los $41\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Biltonen & Lichtenberg, 1993). La temperatura de transición media obtenida en los liposomas es la habitual para liposomas elaborados a partir de ácidos grasos insaturados, pudiendo incluso ser inferior a los $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Hoogevest & Wendel, 2014).

Frente a los ya mencionados problemas que puede inducir el proceso de congelación y también la posterior liofilización sobre las propiedades de los liposomas, la adición en la formulación liposomal de compuestos crioprotectores y lioprotectores es necesaria. Según Stark et al. (2010), el glicerol evita o reduce los daños en los liposomas ocasionados por la liofilización, así como por el proceso previo a ella. El glicerol es una molécula que forma parte de las cabezas polares de los propios fosfolípidos de la membrana, por lo que es presumible que la mayor parte del glicerol añadido en los liposomas se sitúe adherido a estas cabezas polares, aumentando así el espacio entre dos cabezas polares adyacentes (Figura 106).

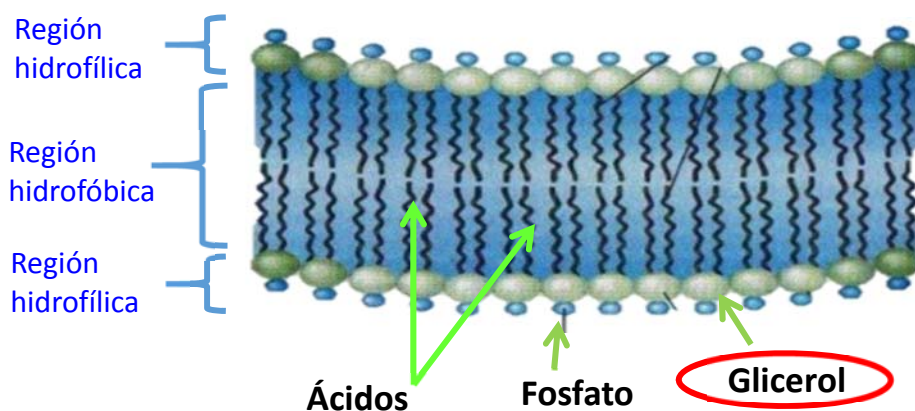


Figura 106. Mecanismo de acción del glicerol en las bicapas lipídicas.

Acorde a Chen et al. (2010), la trealosa es un lioprotector que protege frente a la liofilización mediante sus efectos de reemplazamiento de agua y vitrificación. Stark et al. (2010) defiende que este disacárido actúa como estabilizador de la membrana al preservar el espacio lateral entre las cabezas polares de los fosfolípidos, evitando que éste se reduzca y amplificando las fuerzas de Van der Waals entre las cadenas acilo (Figura 107). Además, también son capaces de formar una matriz vítrea amorfa alrededor de la bicapa.

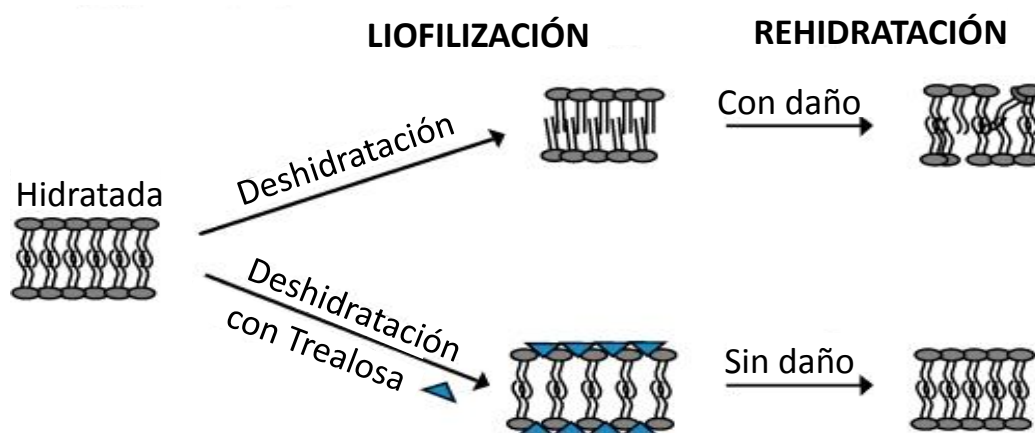


Figura 107. Mecanismo de acción de la trealosa en las bicapas lipídicas, tras liofilización y tras rehidratación.

Para su correcta comparación con las dispersiones frescas, los liposomas desecados deben ser rehidratados, con el fin de que vuelvan a adquirir su conformación liposomal. Los liposomas liofilizados sin glicerol mostraron un tamaño e índice de polidispersidad notablemente mayor ($p \leq 0,05$) que los liposomas control frescos (incremento del 28,1 % y del 47,6 % para el tamaño y la polidispersidad, respectivamente), manteniendo estable el potencial de membrana ($p > 0,05$), resultados que reflejan que la ausencia de glicerol hace a los liposomas susceptibles de sufrir modificaciones. La adición de glicerol como crioprotector y de trealosa como lioprotector en la formulación liofilizada tornó el potencial de membrana más electronegativo, aumentando ligeramente la estabilidad (solo siendo significativo el cambio para los liposomas con glicerol, 10,5 %), e incrementó el tamaño medio de partícula (94,3 % para LF-G y 48,6 % para LF-T) y la polidispersidad (70,2 % para LF-G y 34,7 % para LF-T) con respecto a los liposomas frescos, e incluso en comparación con los liposomas liofilizados sin crio- ni lioprotector. Este incremento fue más acentuado en ambos parámetros para los liposomas con glicerol (45,7 % para el tamaño y 35,5 % para la polidispersidad). Estos resultados indicarían por un lado que el glicerol no es el crioprotector más adecuado si los liposomas se someten a liofilización. Por otro lado, la trealosa, aunque no consigue mantener las propiedades de vesícula intactas, protege a los liposomas de manera eficiente impidiendo en gran medida su expansión. Aunque hay que recordar que los liposomas sin ningún protector añadido son susceptibles de un aumento del tamaño de partícula mucho mayor que en presencia de ellos.

Acorde a los resultados obtenidos por dispersión dinámica de luz podríamos pensar que es preferible no añadir crioprotectores ni lioprotectores si los liposomas van a ser sometidos a liofilización, dado que ambos aumentan su tamaño y heterogeneidad de los mismos. Sin embargo, tanto glicerol como trealosa tienen la capacidad de mejorar la estabilidad de las vesículas y proteger a las membranas lipídicas, siendo el glicerol el más recomendado en este caso, por las razones que se exponen a continuación.

El glicerol reemplaza al agua en su interacción con la membrana y esto provoca la modificación de las cabezas polares de los fosfolípidos que adoptan una conformación más estable con respecto a los liposomas que no incorporan glicerol (Figura 108).

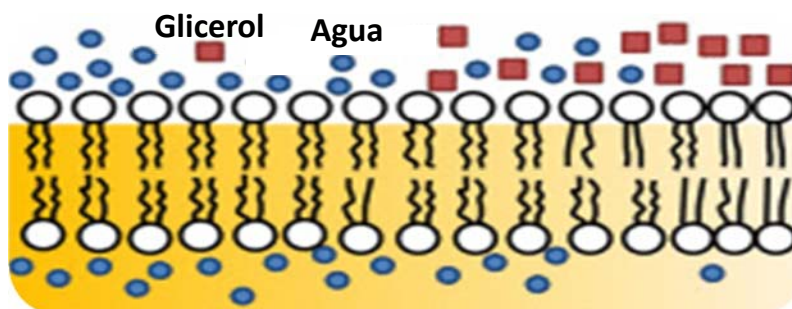


Figura 108. Reemplazamiento del agua en la bicapa lipídica por parte del glicerol.

Además, la posible interferencia de este compuesto con las cadenas hidrocarbonadas altamente insaturadas induce un cambio estructural del interior de la bicapa lipídica, aumentando la movilidad de las mismas y produciendo un efecto de fluidificación, que es capaz de mejorar el ordenamiento y estructura de la membrana, favoreciendo su estabilidad física.

Que la adición de un crioprotector como es el glicerol pueda mejorar la organización interna de la membrana de los liposomas podría no entenderse si estuviéramos tratando con liposomas elaborados a partir de fosfolípidos sintéticos, pues éstos son capaces de formar vesículas muy estables con un ordenamiento muy definido, donde cualquier sustancia adicional que se incorpore provocaría una modificación de la membrana. Esto es debido al elevado grado de pureza de los fosfolípidos, que además presentan cadenas hidrocarbonadas totalmente simétricas, de igual longitud, de ácidos grasos saturados, enlaces *trans* y otras características que permiten la fabricación de bicapas lipídicas con un ordenamiento simétrico y prácticamente perfecto y sin huecos. Kato et al. (2015) demostraron que los liposomas elaborados a partir de fosfolípidos sintéticos (dimiristoilfosfatidilcolina con cadenas hidrocarbonadas uniformes) se transforman más fácilmente (modificaciones morfológicas de sus membranas liposomales) ante la adición de cualquier sustancia que aquellos preparados con fosfolípidos naturales (no sintéticos), como consecuencia de la estructura y organización característica.

En cambio, los fosfolípidos no sintéticos o parcialmente purificados obtenidos a partir de lecitina de soja dan lugar a liposomas con membranas lipídicas imperfectas, donde las impurezas, insaturaciones, enlaces *cis* o cadenas hidrocarbonadas asimétricas (elementos típicos de estos fosfolípidos) inducen un ordenamiento de membrana diferente y no tan perfecto. Esto no significa que no sean estables, sino simplemente que tienen características diferentes. Esta imperfección es la que provoca que dependiendo de la sustancia que añadamos, los efectos sean beneficiosos o perjudiciales. En este trabajo, la adición de glicerol como crioprotector a esta membrana lipídica heterogénea y “desorganizada” provoca un nuevo ordenamiento que mejora su estructura y estabilidad.

La presencia de glicerol confirma la reducción de la capacidad de dispersabilidad en agua de los liposomas que lo incorporan, en comparación con aquellos que no lo incluyen e incluso con aquellos liposomas que incorporan trealosa, donde la dispersabilidad es prácticamente total. Aunque hay que recordar que todos los liposomas, incluidos los liofilizados con glicerol, se resuspendieron rápida y eficientemente en agua, sin embargo, mostraron un precipitado mayor tras ser centrifugados y forzados a precipitar.

Otra diferencia destacable es el contenido en agua residual de estos liposomas desecados, derivado de su consistencia física. Mientras las preparaciones con trealosa mostraron una

apariciencia típica de un polvo fino blanquecino (contenido en agua del 1,53 %), las que incorporan glicerol se presentan como una pasta pegajosa de color marrón-ocre (contenido en agua del 14,87 %). Este elevado contenido en agua es el que le aporta dicha consistencia untuosa, atribuida a la presencia de glicerol y más concretamente a su elevada densidad ($1,26 \text{ g/cm}^3$), dado que los liposomas sin protector también presentaron apariciencia de polvo fino con un contenido en agua del 4,78 %. Estas texturas tan diferentes permiten la aplicación de una u otra formulación liposomal en función de cuales sean los requerimientos y del objetivo final que se pretenda, siendo todas las formulaciones estudiadas adecuadas para su aplicación en el ámbito de la alimentación.

Atomización

Otro método de estabilización de vesículas por secado es la atomización, proceso que no requiere la congelación previa de la muestra, pero que puede someterla a un pequeño estrés térmico. Las dispersiones liposomales se someten a este tratamiento en estado líquido y se obtiene directamente un producto seco. La técnica se basa en el secado de las dispersiones mediante aspiración con aire seco y caliente. Posee algunas ventajas, así como algún inconveniente. Entre las ventajas destaca que es un proceso mucho más eficiente a nivel energético y, por tanto, más económico, y la rapidez tanto de utilización (no requiere ningún procesado previo) como de aplicación (el proceso de atomización es relativamente rápido y se pueden atomizar varios litros en unas pocas horas). Entre los inconvenientes mencionar que los rendimientos son más bajos que en la liofilización, es decir, hace falta mucha cantidad líquida de dispersión para obtener una cantidad considerable de producto seco, y también que los liposomas podrían ser susceptibles del daño en sus membranas por oxidación, dado que se eleva bastante la temperatura de la preparación liposomal.

Los liposomas atomizados tuvieron un tamaño y polidispersidad semejante a los liposomas liofilizados sin protector añadido, siendo por tanto superior a los liposomas frescos control (25,9 % para el tamaño y 74,7 % para la polidispersidad) pero inferior a los liposomas con glicerol y con trealosa. Estos resultados reflejan que el proceso de secado (liofilización y atomización) es uno de los factores que aumentan el tamaño de las vesículas, siendo el otro el compuesto protector añadido. Teóricamente, dado que los liposomas atomizados no son congelados ni liofilizados, no son susceptibles de sufrir modificaciones internas que afecten a la estabilidad de sus membranas, al menos por estos tratamientos, aunque no hay que olvidar que sufren un choque de calor (170°C), si bien es puntual. Esto podría sugerir que los liposomas atomizados mantienen un tamaño relativamente cercano a los liposomas control (como los liofilizados) pero manteniendo una mejor estructura y organización de membrana que éstos. Como era de esperar, estos liposomas presentaron una dispersabilidad en agua completa debido a la ausencia de glicerol. Sin embargo, mostraron un elevado contenido en agua residual (19,20 %), atribuido al rápido proceso de secado. Al igual que con las formulaciones liofilizadas anteriores, los liposomas atomizados ofrecen una serie de posibles aplicaciones alternativas en función de su contenido en agua y consistencia física.

En resumen, existen diferentes estrategias de estabilización de liposomas, algunas de ellas no modifican las propiedades de partícula de las vesículas como son las altas presiones hidrostáticas y la congelación-descongelación (cuando se incorpora glicerol) y otras sí lo hacen, como son la liofilización y la atomización, aunque tienen otros beneficios, como por ejemplo su facilidad de almacenamiento, manejo y transporte. Además, la versatilidad de unas y otras preparaciones permite un abanico de posibilidades a la hora de su aplicación en el diseño de productos. Por tanto, todas las formulaciones podrían ser empleadas en función del estado de hidratación de la muestra y del tamaño medio de sus vesículas, dependiendo de cuál sea el objetivo buscado.

Entre todos los ensayados, los liposomas liofilizados con el crioprotector glicerol fueron los que consideramos más interesantes debido a que, a pesar de tener un tamaño superior al resto, presentaron propiedades de partícula muy aceptables con una excelente estabilidad de membrana, cuya estructura interna está mejor organizada. Además, su particular textura ofrece una amplia gama de posibles aplicaciones, como son su incorporación en otras matrices alimentarias tipo músculos de pescado o películas comestibles, donde su consistencia liofilizada y la presencia de glicerol permiten la obtención de una matriz nueva con diferentes y variadas propiedades estructurales y potenciales. Esta habilidad les permite funcionar como ingredientes alimentarios de alto valor añadido para la reformulación de productos y alimentos. Por tanto, las próximas dispersiones liposomales rellenas con los diferentes extractos bioactivos serán sometidas al proceso de secado por liofilización para mejorar su estabilidad, previa incorporación de glicerol en el proceso de elaboración.

9.3.2. Liposomas rellenos

Liofilización

Las dispersiones liposomales conteniendo extractos bioactivos fueron adicionadas con glicerol como crioprotector y posteriormente liofilizadas, obteniéndose así diferentes liofilizados: L-HC, L-PG, L-GC, L-HM-acuoso y L-HM-etanólico. La liofilización fue el único método de estabilización de vesículas estudiado en este caso. Dada la consistencia y apariencia de los liposomas liofilizados, éstos también se nombrarán como pastas o pastas liofilizadas.

Tras el proceso de liofilización, todos los liposomas incrementaron ($p \leq 0,05$) su tamaño medio (262,2 % para L-V; 264,9 % para L-GC; 76,1-168,7 % para el resto de liposomas) y su índice de polidispersidad (2,2-65,9 %; con la excepción de L-HM-ac 32 que disminuyó un 3,7 %) (Tabla 48).

Tabla 48. Características de partícula (tamaño medio, índice de polidispersidad y potencial zeta) de liposomas liofilizados. El número adyacente a cada liposoma indica su concentración de bioactivo en porcentaje (%) respecto a la fosfatidilcolina. Diferentes letras (a, b, c, d, e, f) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre liposomas.

| Muestra | % bioactivo | Tamaño (nm) | Polidispersidad | Potencial zeta (mV) |
|---------|-------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| L-V | 0 | 316,6 ± 6,7 ^e | 0,374 ± 0,081 ^a | -54,2 ± 1,5 ^b |
| L-HC | 4 | 274,9 ± 5,5 ^d | 0,334 ± 0,033 ^a | -54,9 ± 0,7 ^b |
| L-PG | 4 | 256,8 ± 2,3 ^c | 0,279 ± 0,021 ^a | -57,2 ± 0,5 ^{ab} |
| L-GC | 4 | 372,9 ± 15,9 ^f | 0,408 ± 0,112 ^a | -59,1 ± 2,2 ^a |
| L-HM-ac | 8 | 171,1 ± 1,6 ^a | 0,341 ± 0,004 ^a | -46,1 ± 1,1 ^{cd} |
| L-HM-ac | 16 | 249,4 ± 4,0 ^c | 0,430 ± 0,010 ^a | -44,6 ± 1,3 ^d |
| L-HM-ac | 32 | 230,2 ± 1,0 ^b | 0,332 ± 0,046 ^a | -40,0 ± 1,3 ^e |
| L-HM-ac | 64 | 311,4 ± 4,4 ^e | 0,378 ± 0,025 ^a | -34,2 ± 0,9 ^f |
| L-HM-et | 8 | 225,4 ± 1,8 ^b | 0,388 ± 0,067 ^a | -47,3 ± 1,2 ^{cd} |
| L-HM-et | 16 | 219,3 ± 6,1 ^b | 0,371 ± 0,046 ^a | -48,2 ± 1,1 ^c |
| L-HM-et | 32 | 225,1 ± 4,5 ^b | 0,364 ± 0,039 ^a | -40,3 ± 2,3 ^e |
| L-HM-et | 64 | 216,4 ± 2,1 ^b | 0,377 ± 0,010 ^a | -37,5 ± 0,5 ^e |

Estas variaciones podrían ser debidas a fenómenos de fusión o agregación ocasionados por la eliminación del agua en la muestra (Chen et al., 2010) y a la hinchazón de la bicapa tras la

rehidratación, lo que provoca la rotura de puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua y las cabezas polares de los fosfolípidos (Stark et al., 2010). Del mismo modo, se incrementó ($p \leq 0,05$) el potencial electronegativo de membrana de todos los liposomas tras la liofilización (9 % para L-HM-ac 32 y 21,8-52,7 % para el resto de liposomas), mejorando así la estabilidad de todas las preparaciones liposomales resuspendidas.

El tamaño medio y el perfil de distribución de tamaños de los liposomas liofilizados dependieron únicamente del tipo de bioactivo encapsulado, dado que el índice de polidispersidad no mostró diferencias ($p > 0,05$) entre liposomas, conservando todos una distribución predominantemente monomodal, y que algunos liposomas de menor concentración de bioactivo tuvieron un mayor tamaño medio. Entre todos ellos, los liposomas de hinojo con extracto acuoso al 8 % (L-HM-ac 8) fueron los más pequeños con un tamaño de 171,1 nm, lo que coincide con una fracción hidrofílica presumiblemente situada en el interior del liposoma y con polifenoles de tamaño no muy grande, ya que, como se apreció en el perfil cromatográfico, predominaba la presencia de ácido clorogénico y vitamina C de manera destacada. Por otro lado, los liposomas liofilizados de grasa de crustáceo (L-GC) fueron los más grandes, con un tamaño de 379,9 nm, coincidiendo con su mayor valor de índice de polidispersidad (0,408). El mayor tamaño de L-GC podría atribuirse a la naturaleza lipofílica del extracto y a la presencia de vesículas multilamelares en estos liposomas tras ser liofilizados. Probablemente la interacción y localización preferente de la grasa de crustáceo en el interior de la bicapa incrementa la superficie de la membrana y por tanto el tamaño promedio del liposoma. Además, debido a la heterogeneidad de la composición, probablemente sea más flexible la membrana y de lugar o facilite un mayor número de invaginaciones favoreciendo la formación de vesículas multilamelares.

Si nos fijamos en los liposomas rellenos con extracto acuoso de hinojo marino, se aprecia una tendencia creciente en el tamaño a mayor concentración de bioactivo. Estos resultados sugieren que la concentración del extracto bioactivo en liposomas liofilizados solo influye si comparamos entre preparaciones con el mismo extracto. Sin embargo, esta tendencia no fue observada para los liposomas rellenos con el extracto etanólico del hinojo marino, volviendo a ser clave la naturaleza y composición del bioactivo. Así, por ejemplo, se observó que en el extracto etanólico la concentración de ácido clorogénico era mayor que en el acuoso, además de la presencia de vitamina C en el acuoso y de rutina y ácido rosmarínico en el etanólico. Por tanto, los liposomas poseerán diferentes propiedades en función de la capacidad de empaquetamiento de unos y otros compuestos en el interior del liposoma, así como del carácter hidrofóbico de cada uno de ellos.

En realidad, el tamaño medio de las vesículas no depende únicamente de la naturaleza y composición del extracto bioactivo y/o de la concentración del mismo en los liposomas, pues intervienen multitud de factores. Entre ellos caben destacar tanto los debidos a la naturaleza y composición de la materia prima, como los debidos al procesado (condiciones de elaboración, clase de crioprotector, las proporciones entre cada componente), condiciones conservación, de congelación (Arshinova et al., 2012), así como las condiciones de liofilización (Rasouljanboroujeni et al., 2017), etc. Para hacer una idea, citemos por ejemplo la sonicación. El tamaño final de los liposomas varía en función de las condiciones de ésta, hasta tal punto que incluso la cantidad de dispersión o la colocación de la probeta de sonicación influyen en el tamaño final de los liposomas. Eso sí, a idénticas condiciones y composición los liposomas deberían ser prácticamente iguales.

El potencial zeta de los liposomas liofilizados (Tabla 48), al igual que sucede en las dispersiones, sigue una proporcionalidad en función de la concentración de bioactivo, donde menores concentraciones dan lugar a potenciales más electronegativos, mostrando nuevamente todos los liposomas un excelente potencial y estabilidad de membrana. De este modo, los liposomas

sin extracto (L-V) y los rellenos de HC, PG y GC fueron los más electronegativos, seguidos de los liposomas de hinojo en orden creciente de cantidad de bioactivo. Al igual que con los parámetros de tamaño y polidispersidad, no solo la presencia y el tipo de extracto bioactivo determinan la carga de superficie de membrana, sino que también influyen otros factores como la composición del material encapsulante o la posible presencia de protectores externos. El análisis multivariante de los parámetros estudiados hasta el momento (concentración de bioactivo, tamaño, polidispersidad y potencial zeta) de los liposomas liofilizados rellenos determinó que existe una correlación positiva entre la concentración y el potencial zeta (0,85), de manera que a mayor concentración de bioactivo, menos electronegativo será el potencial zeta. Estos resultados coinciden con los de las dispersiones liposomales.

Cuando las dispersiones se liofilizaron (L-V, L-HC, L-PG y L-GC), las vesículas incrementaron su tamaño así como la heterogeneidad de los mismos, observándose mediante microscopía electrónica de transmisión por criofijación dos poblaciones diferenciadas de distinto tamaño, acorde a los resultados obtenidos en dispersión dinámica de luz. Se aprecia un mayor número de fenómenos de invaginación y estructuras bi- y multivesiculares, así como vesículas bi-, tri- e incluso multilamelares (como en L-GC, lo que explica su mayor tamaño medio y polidispersidad), como consecuencia del proceso de liofilización (Figura 43; capítulo 2). Es importante destacar que los liposomas mantienen su estructura coloidal de vesículas tras ser liofilizados y posteriormente rehidratados, permitiendo la protección del bioactivo.

La eficacia de encapsulación de los liposomas liofilizados aumentó ligeramente en todas las muestras respecto a su eficacia como dispersiones (Tabla 49), obteniéndose valores del 87,3 % para L-HC, del 97,2 % para L-GC y del 63,2 % para L-PG, con la excepción de L-HM-ac, donde la eficacia se mantuvo estable ($p > 0,05$). Este incremento podría deberse bien a que existe una mínima liberación de bioactivo por parte de los liposomas contenidos en las dispersiones, o bien a que en el momento de liofilización la dispersión sufre un proceso de compactación y agregación como consecuencia de la pérdida de agua, proceso que podría provocar que parte del bioactivo no encapsulado quede adherido a la superficie externa de los liposomas, pasando a formar parte del bioactivo encapsulado. Este incremento fue más acusado en el liposoma con grasa de crustáceo, hasta una encapsulación casi completa.

Tabla 49. Eficacia de encapsulación de los liposomas liofilizados. El número adyacente a cada liposoma indica su concentración de bioactivo en porcentaje (%) respecto a la fosfatidilcolina. Diferentes letras (a, b, c, d) indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre liposomas liofilizados.

| Muestra | % bioactivo | Eficacia de encapsulación (%) |
|---------|-------------|-------------------------------|
| L-HC | 4 | $87,3 \pm 2,0^c$ |
| L-PG | 4 | $63,2 \pm 3,9^b$ |
| L-GC | 4 | $97,2 \pm 0,1^d$ |
| L-HM-ac | 64 | $65,6 \pm 3,4^b$ |
| L-HM-et | 64 | $49,1 \pm 0,5^a$ |

En las preparaciones liofilizadas las eficacias de encapsulación de los liposomas conteniendo el extracto peptídico y el extracto lipídico fueron muy elevadas con valores superiores al 87 %. Sin embargo, los liposomas con extractos polifenólicos, dada su naturaleza, poseen eficacias mucho menores, con valores del 63,2 % para L-PG, 65,6 % para L-HM-ac 64 y 49,1 % para L-HM-et 64. Como vemos, la eficacia de encapsulación en liposomas liofilizados parece depender del tipo de extracto bioactivo (diferencias significativas $p \leq 0,05$ de L-HC y L-GC respecto a L-PG, y de

L-HM-ac respecto a L-HM-et) y no tanto de la concentración, pues los tres liposomas con extracto polifenólico mantuvieron resultados relativamente similares (sin diferencias $p > 0,05$ entre L-PG y L-HM-ac), a pesar de las grandes diferencias de concentración de bioactivo encapsuladas (4 % respecto a 64 %).

En cuanto al contenido en agua residual de los liposomas liofilizados (Tabla 50), se reduce un 73,2-79,9 % con respecto al de las dispersiones (≈ 90 %), consiguiendo una desecación considerable como método de estabilización. Los resultados no dependieron de ningún otro parámetro estudiado en los liposomas, como son el tamaño de partícula, la concentración de bioactivo o el tipo de extracto encapsulado, siendo las diferencias probablemente atribuidas al proceso de liofilización que, aunque siempre se llevó a cabo en las mismas condiciones (tiempo y temperatura de congelación, recipiente y cantidad de congelación y liofilización, parámetros de la liofilización, etc.), podría estar variando (siendo más o menos eficiente en la eliminación del agua residual) en cada lote de liposomas (14,8-38,1 %). Hay que mencionar que se observa una tendencia al incremento del contenido en agua residual en los liposomas rellenos respecto a los vacíos, únicamente siendo inferior en los liposomas L-HM-ac 32 en comparación con los vacíos (18,5 %), posiblemente debido a que la presencia del bioactivo interacciona con el agua y dificulta parcialmente la eliminación de ésta de la muestra por su interferencia con las membranas lipídicas. Entre los liposomas con bioactivos, L-HM-ac 32 presentó el menor valor (14,8 %) y L-HM-ac 8 el mayor (38,1 %). Estos datos son algo elevados para tratarse de muestras que han sido secadas por liofilización, los cuales se atribuyen a la gran higroscopicidad que manifiesta el glicerol presente en la formulación, tal y como ya se vio para los liposomas vacíos liofilizados, pudiendo verse favorecida a su vez por las propiedades del extracto incorporado.

Tabla 50. Contenido en agua (%) y dispersabilidad en agua (%) de los liposomas liofilizados. El número adyacente a cada liposoma indica su concentración de bioactivo en porcentaje (%) respecto a la fosfatidilcolina. Diferentes letras (a, b, c, d, e, f, g) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre liposomas.

| Muestra | % bioactivo | Contenido en agua (%) | Dispersabilidad en agua (%) |
|---------|-------------|-----------------------|-----------------------------|
| L-V | - | $18,5 \pm 2,2^{ab}$ | $73,6 \pm 2,6^b$ |
| L-HC | 4 | $21,3 \pm 1,1^{bc}$ | $76,5 \pm 0,4^{bc}$ |
| L-PG | 4 | $24,4 \pm 2,6^{cd}$ | $80,9 \pm 1,7^{cde}$ |
| L-GC | 4 | $24,9 \pm 4,6^{cd}$ | $65,2 \pm 1,3^a$ |
| L-HM-ac | 8 | $38,1 \pm 0,6^f$ | $86,4 \pm 6,8^{ef}$ |
| L-HM-ac | 16 | $30,5 \pm 1,4^e$ | $91,6 \pm 1,4^f$ |
| L-HM-ac | 32 | $14,8 \pm 1,9^a$ | $82,4 \pm 2,7^{de}$ |
| L-HM-ac | 64 | $20,9 \pm 1,2^{bc}$ | $81,4 \pm 4,7^{cde}$ |
| L-HM-et | 8 | $27,0 \pm 0,8^{de}$ | $79,9 \pm 2,5^{cd}$ |
| L-HM-et | 16 | $37,4 \pm 2,5^f$ | $88,2 \pm 1,8^f$ |
| L-HM-et | 32 | $22,8 \pm 1,2^{bcd}$ | $82,5 \pm 1,2^{de}$ |
| L-HM-et | 64 | $31,1 \pm 2,6^e$ | $100,0 \pm 0,0^g$ |

La dispersabilidad en agua de los liposomas rellenos liofilizados (Tabla 50) disminuyó ligeramente en comparación con la de las dispersiones. Esta capacidad no está relacionada con el tamaño de partícula ni con el contenido en agua residual de la muestra. Los resultados

parecen indicar que podría depender tanto de la naturaleza del extracto bioactivo como de la concentración del mismo. Todos los liposomas de hinojo marino, independientemente del tipo de extracto (acuoso o etanólico) y de su concentración, mostraron una mejor dispersabilidad que los liposomas rellenos con el resto de bioactivos. Los liposomas de hinojo presentan mayor concentración de bioactivo que los demás, por lo tanto, cabría suponer que liposomas con concentraciones de bioactivo superiores al 4 % tienden a presentar una mejor capacidad de dispersión en agua. Sin embargo, no se encontró una proporcionalidad directa con concentraciones crecientes (8, 16, 32 y 64 %) de bioactivo en los liposomas de hinojo para ninguno de sus extractos, siendo L-HM-et 64 el de mayor capacidad (100,0 %).

Por otro lado, la naturaleza del extracto también tiene influencia en este parámetro. Por ejemplo, el extracto de grasa de crustáceo (GC) es un bioactivo de naturaleza fuertemente lipofílica (como demostró su caracterización), lo que dificulta su solubilidad en agua y la menor capacidad de dispersión en agua de los liposomas que lo incorporan (L-GC), presentando el menor valor (65,2 %). Sin embargo, tampoco se observa una relación clara entre extractos de hinojo a igual concentración, por lo que, probablemente, la dispersabilidad en agua de los liposomas esté influenciada parcialmente por la combinación del tipo de bioactivo y su concentración, pudiendo influir otros aspectos. La importancia del extracto es corroborada dado que todos los liposomas rellenos de bioactivos mostraron una capacidad de dispersión mayor que la de los liposomas vacíos (L-V), indicando que el bioactivo favorece su dispersión en agua. En términos generales todos mostraron una buena dispersabilidad en agua, lo que podría reflejar su buena disponibilidad para ser transportadores eficientes de compuestos bioactivos al interior del organismo (Li et al., 2017).

El color de las dispersiones liposomales (Figura 109) fue diferente en función del extracto bioactivo incorporado, indicando que es el extracto, fundamentalmente la fracción no encapsulada, el que determina el color final de las preparaciones liposomales. Así, los liposomas con hidrolizado de colágeno tuvieron un color amarillento, los liposomas de piel de granada un color marrón oscuro, los liposomas de grasa de crustáceo un color rojo-anaranjado, mientras que los liposomas de hinojo marino un color verdoso, tanto los que contienen extracto acuoso como etanólico.



Figura 109. Aspecto visual de las dispersiones liposomales rellenas con extractos bioactivos. Izquierda: L-HC; Centro: L-PG; Derecha: L-GC.

Cuando los liposomas se liofilizaron (Figura 110) éstos mantuvieron el color original de sus extractos.



Figura 110. Aspecto visual de los liposomas liofilizados rellenos con extractos bioactivos. Izquierda: L-HC; Centro: L-PG; Derecha: L-GC.

Por tanto, el color es un parámetro que depende fuertemente del tipo de extracto encapsulado, ya que las diferentes concentraciones de bioactivo en los liposomas de hinojo marino no reflejaron ninguna relación con ninguno de los parámetros de color estudiados. Hay que mencionar que el proceso de liofilización mantiene el color original de la dispersión, pero tiende a oscurecer las pastas liofilizadas resultantes, es decir aumenta la cromaticidad. De este modo, los liposomas liofilizados se mantuvieron en un estrecho rango de valores de cromaticidad, destacando L-HC con la mayor saturación y L-HM-ac 32 con la menor. Respecto a la tonalidad, los valores fueron muy similares debido a este fenómeno de oscurecimiento, con la excepción de L-GC (39,25) que presentó un valor muy diferente al resto de formulaciones, atribuido a su marcado color naranja.

Los liposomas liofilizados, a diferencia de las dispersiones liposomales, presentan una única transición de fase (Tabla 51), relacionada no con la fusión del agua, sino con la estructura y estabilidad de las membranas lipídicas de los liposomas, lo que origina que dicha transición sea muy difusa como consecuencia de su bajo contenido en agua. El valor de la temperatura de transición para los liposomas vacíos (L-V) fue la media de los valores obtenidos en los dos trabajos experimentales (8.2. y 8.3.; capítulo 2). Este valor (2,19 °C) fue intermedio entre el resto de formulaciones con bioactivos.

Tabla 51. Temperatura (°C) asociada a la transición de fase observada por Calorimetría Diferencial de Barrido de los liposomas liofilizados. El número adyacente a cada liposoma indica su concentración de bioactivo en porcentaje (%) respecto a la fosfatidilcolina. Diferentes letras (a, b, c, d, e, f) indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre liposomas.

| Muestra | % bioactivo | Temperatura (°C) |
|---------|-------------|---------------------------|
| L-V | - | 2,19 ± 0,72 ^{ab} |
| L-HC | 4 | 2,04 ± 0,00 ^{ab} |
| L-PG | 4 | 1,76 ± 0,47 ^{ab} |
| L-GC | 4 | 11,05 ± 0,93 ^f |
| L-HM-ac | 8 | 0,97 ± 0,01 ^a |
| L-HM-ac | 16 | 1,47 ± 0,18 ^a |
| L-HM-ac | 32 | 2,95 ± 0,16 ^{bc} |
| L-HM-ac | 64 | 4,44 ± 0,57 ^{de} |
| L-HM-et | 8 | 2,11 ± 0,10 ^{ab} |
| L-HM-et | 16 | 2,01 ± 0,01 ^{ab} |
| L-HM-et | 32 | 3,59 ± 0,53 ^{cd} |
| L-HM-et | 64 | 5,34 ± 0,63 ^e |

Nuevamente, la naturaleza y concentración del bioactivo son factores determinantes en las propiedades físicas y estructurales de los liposomas liofilizados. Así, cantidades crecientes de un mismo extracto bioactivo (L-HM-acuoso y L-HM-etanólico) muestran una mayor temperatura de transición de fase. Del mismo modo, hay extractos que presentan una mayor temperatura que otros a igual concentración, como son los etanólicos de hinojo marino respecto a sus correspondientes acuosos. Por tanto, los liposomas rellenos de extracto etanólico de hinojo marino a la mayor concentración estudiada (64 %) presentaron la mayor temperatura de transición (5,34 °C), asociada con una mayor rigidez y estabilidad de membrana, en comparación

con el resto de formulaciones liposomales de hinojo (0,97-4,44 °C). Sin embargo, la importancia del extracto bioactivo es tal que los liposomas de grasa de crustáceo (L-GC), con una concentración de bioactivo del 4 % (inferior a cualquiera de los liposomas de hinojo), mostraron una temperatura mucho más elevada (11,05 °C) que el resto de formulaciones, como consecuencia de su naturaleza lipofílica y localización preferente entre las cadenas hidrofóbicas del interior de la bicapa, lo cual le aporta una mayor estabilidad térmica de membrana.

En resumen, el proceso de liofilización incrementa el tamaño de los liposomas, pero también su eficacia de encapsulación y mejora la estabilidad de los mismos, aumentando así su vida útil. Nuevamente los factores de naturaleza del extracto y concentración de bioactivo determinan las propiedades físico-estructurales de los liposomas liofilizados, presentando todos ellos adecuadas características de partícula y propiedades estructurales para ser empleados en la industria como productos o ingredientes alimentarios.

Conservación en estado congelado

Al igual que en el caso de las dispersiones liposomales, se seleccionaron tres preparaciones liofilizadas de liposomas rellenos de extractos (L-HC, L-PG y L-GC), todos ellos a la misma concentración (4 %), para estudiar su estabilidad en el tiempo tras ser conservados durante 7 meses a temperaturas de congelación (-20 °C). Las tres pastas liofilizadas estudiadas presentaron un incremento de su dureza y rigidez con el progresivo transcurso de los meses, reflejando un mayor grado de agregación/compactación de su estructura, sin pérdidas del bioactivo encapsulado, lo que demuestra en cierto modo que se mantienen relativamente estables en el tiempo almacenados en congelación. Entre ellos, destacan los liposomas de grasa de crustáceo (L-GC) por ser los de mayor estabilidad, la cual se ve incrementada en el tiempo debido a la naturaleza lipofílica del extracto, que permite un mejor ordenamiento de membrana. En contraste, los liposomas de piel y albedo de granada (L-PG) serían los de peor estabilidad física y estructural, siendo más susceptibles de modificaciones durante su conservación, lo cual podría estar relacionado con la menor eficacia de encapsulación del extracto. En definitiva, aunque hay que tener en cuenta las pequeñas modificaciones que pueden sufrir los liposomas cuando son conservados, podemos afirmar que estas formulaciones liposomales liofilizadas fueron estables a temperaturas de congelación (-20 °C) durante al menos 7 meses, destacando que los bioactivos se mantuvieron eficientemente encapsulados durante todo el proceso de conservación.

Aptitud funcional

Las pastas liofilizadas de liposomas rellenos mostraron un comportamiento reológico estable durante la conservación a largo plazo, con ligeras variaciones en función de la naturaleza y composición del bioactivo. Estos liposomas presentaron una consistencia típica de un fluido viscoso concentrado, más que de un material sólido, en parte debido a la presencia de glicerol en la formulación, que provocó la fluidificación de las pastas y el incremento de su estado de hidratación. Estas propiedades coinciden con el elevado contenido en agua observado previamente en estas pastas liofilizadas, atribuido igualmente a la presencia del glicerol. Como ya se mencionó, esta particularidad, presentándose en forma de pasta untuosa y no como un polvo fino de aspecto desecado, junto con sus particulares propiedades estructurales, ofrece diferentes posibilidades de uso y aplicación, ya sea por sí mismos o en combinación con otros componentes. Una de ellas es la ser materiales adecuados para ser incorporados como ingredientes funcionales en matrices alimentarias, este es el caso de los productos reestructurados, tanto de carne como de pescado, o películas comestibles a partir de polímeros naturales. La peculiar consistencia de los liposomas liofilizados les podría facilitar su correcta

homogeneización con las matrices, permitiendo además ajustar el contenido en humedad de los productos resultantes.

Los liposomas de este trabajo están elaborados a partir de fosfatidilcolina parcialmente purificada, rica en ácidos grasos insaturados (tanto mono- como poliinsaturados), teniendo como ácido graso principal y mayoritario el ácido linoleico ($\approx 59\%$), un ácido graso insaturado. La predominancia de ácidos grasos insaturados en una muestra puede dar lugar a la formación de hidroperóxidos y productos de oxidación secundaria (Wang & Wang, 2008), desencadenando la oxidación lipídica y el deterioro de la muestra por rancidez. Por tanto, nuestros liposomas serían susceptibles de sufrir oxidación lipídica como consecuencia de su composición rica en ácidos grasos insaturados. La conservación de los liposomas liofilizados en congelación bajo las condiciones ensayadas (Figura 111) no fue suficiente para prevenir la oxidación parcial de los liposomas, a pesar de la incorporación de extractos bioactivos con capacidades antioxidantes, y quizá sería interesante llevar a cabo nuevas estrategias en un futuro a la hora de elaborar, liofilizar y conservar los liposomas, con el fin de reducir aún más los niveles de oxidación, por ejemplo mediante su incorporación en otras matrices alimentarias, o recubriendo los liposomas. Aun así, hay que mencionar que el grado de oxidación lipídica apreciado en los liposomas fue bastante bajo, siendo todos ellos relativamente estables durante al menos 7 meses.

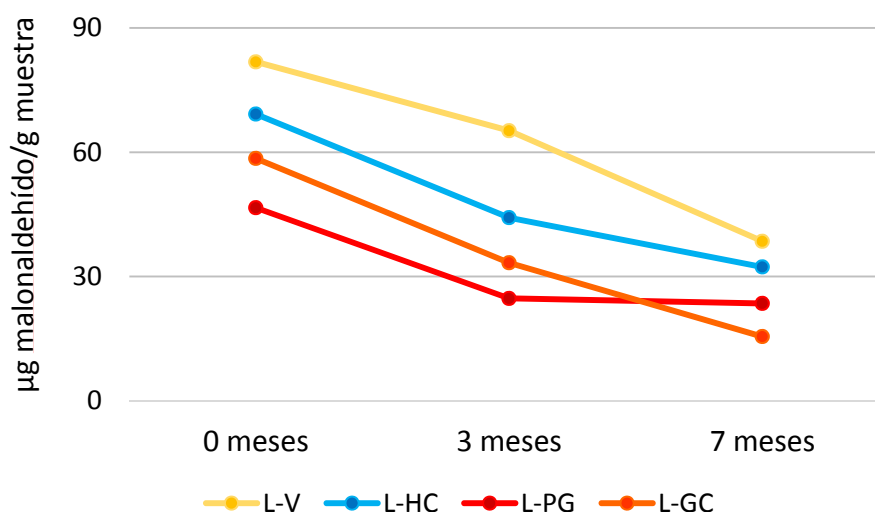


Figura 111. Efecto oxidativo, expresado como contenido acumulado del producto de oxidación malonaldehído, de los liposomas vacíos y rellenos liofilizados recién preparados y conservados en congelación ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 7 meses.

Uno de los aspectos clave para que estos liposomas liofilizados puedan actuar como productos funcionales es el potencial que pueden mostrar sus propiedades biológicas con beneficios para la salud derivadas de los bioactivos encapsulados, o de la propia materia prima que constituye el liposoma. En los capítulos ya se vio reflejado el enorme poder antioxidante de todos los extractos bioactivos, siendo superior en aquellos de composición polifenólica (PG y HM) respecto a los lipídicos (GC) y los peptídicos (HC y FP1). Ahora se tratará de mostrar el efecto de los bioactivos encapsulados.

Hay que tener en cuenta que los liposomas son vesículas capaces de englobar y proteger a los extractos bioactivos en su interior. Por ello, los liposomas no deberían mostrar actividad antioxidante, más que la que pueda aportar la propia cápsula, dado que los bioactivos están encapsulados y protegidos. Sin embargo, dada la naturaleza y composición de cada extracto bioactivo, hemos comprobado que éstos se pueden localizar en distintos compartimentos o zonas de los liposomas: tanto en el interior de la bicapa lipídica si son hidrofóbicos como en el

núcleo acuoso o adheridos a las cabezas polares de los fosfolípidos que asoman hacia el exterior de la membrana si son hidrofílicos (Figura 112). De este modo, existe cierta cantidad de bioactivo (la que “asoma” hacia el exterior, bien porque esté adherida a las cabezas polares externas o bien porque se trate de una molécula de gran longitud y doble carácter procedente de la bicapa lipídica), que podría interaccionar con los cromóforos de las técnicas utilizadas para determinar las actividades y dar medida como actividad antioxidante. Otra parte del bioactivo que podría reflejar actividad antioxidante es aquella no encapsulada dentro de los liposomas pero que se encuentra libre en la matriz liposomal, entre las vesículas.

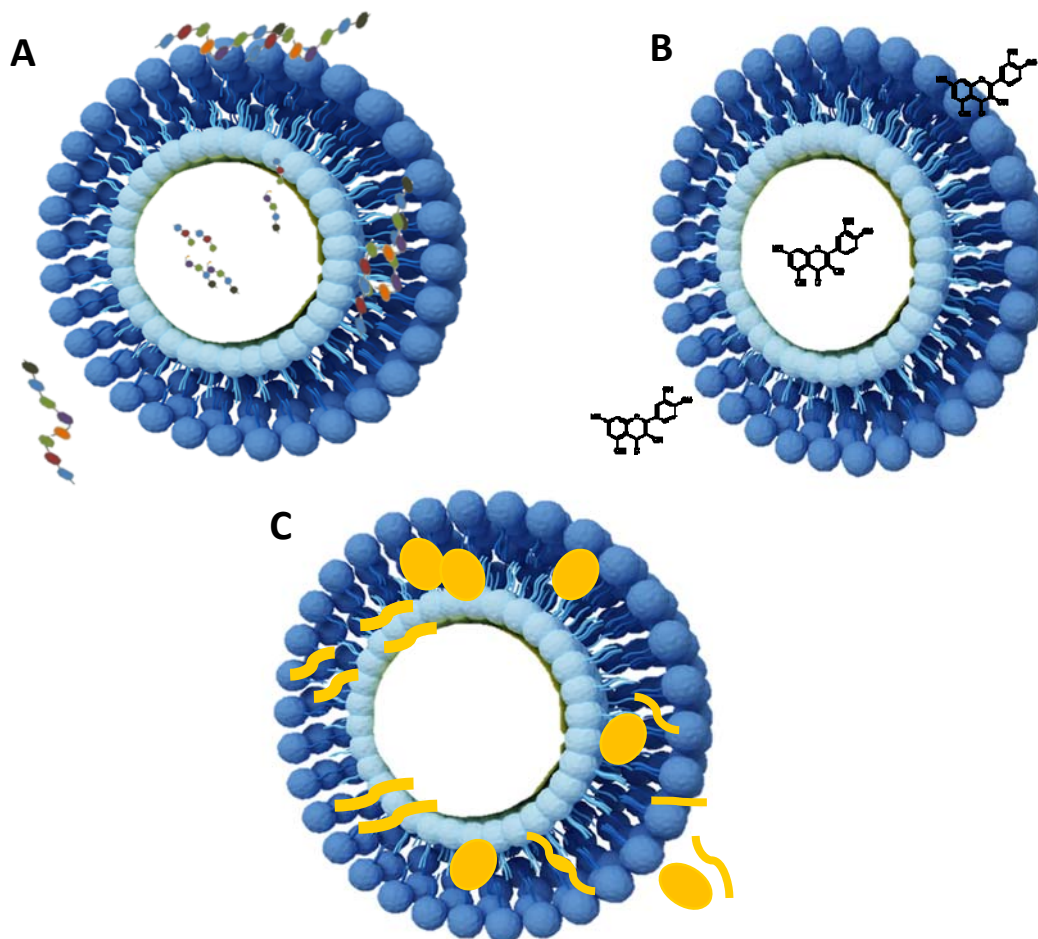


Figura 112. Esquema de la posible localización de los extractos bioactivos en los liposomas en función de la naturaleza y composición de los primeros. A) Extractos peptídicos. B) Extractos polifenólicos. C) Extractos lipídicos.

Todos los liposomas mostraron actividad antioxidante, siendo siempre menor que la de sus respectivos extractos libres puros, lo que confirma que solo se está cuantificando parte de la actividad del extracto; el resto estaría dentro de los liposomas sin interacción con el exterior, como cabía esperar ya que se trata de liposomas enteros y rellenos. Por otro lado, la mayoría de liposomas rellenos mostraron mayor actividad que los liposomas vacíos (L-V), con las excepciones de L-HC y L-GC para la técnica de secuestro de radicales libres y L-HM-ac 8 para la técnica de poder reductor del hierro. Estos resultados indican que la cápsula tiene un mínimo poder antioxidante, no atribuible a la actividad cuantificada en los liposomas rellenos de bioactivos, confirmando el potencial bioactivo de los extractos.

La cuantificación por los métodos de secuestro de radicales libres (ABTS), poder reductor del hierro (FRAP) y contenido de sustancias reactivas al Folin-Ciocalteu de los liposomas liofilizados se muestra en la figura 113.

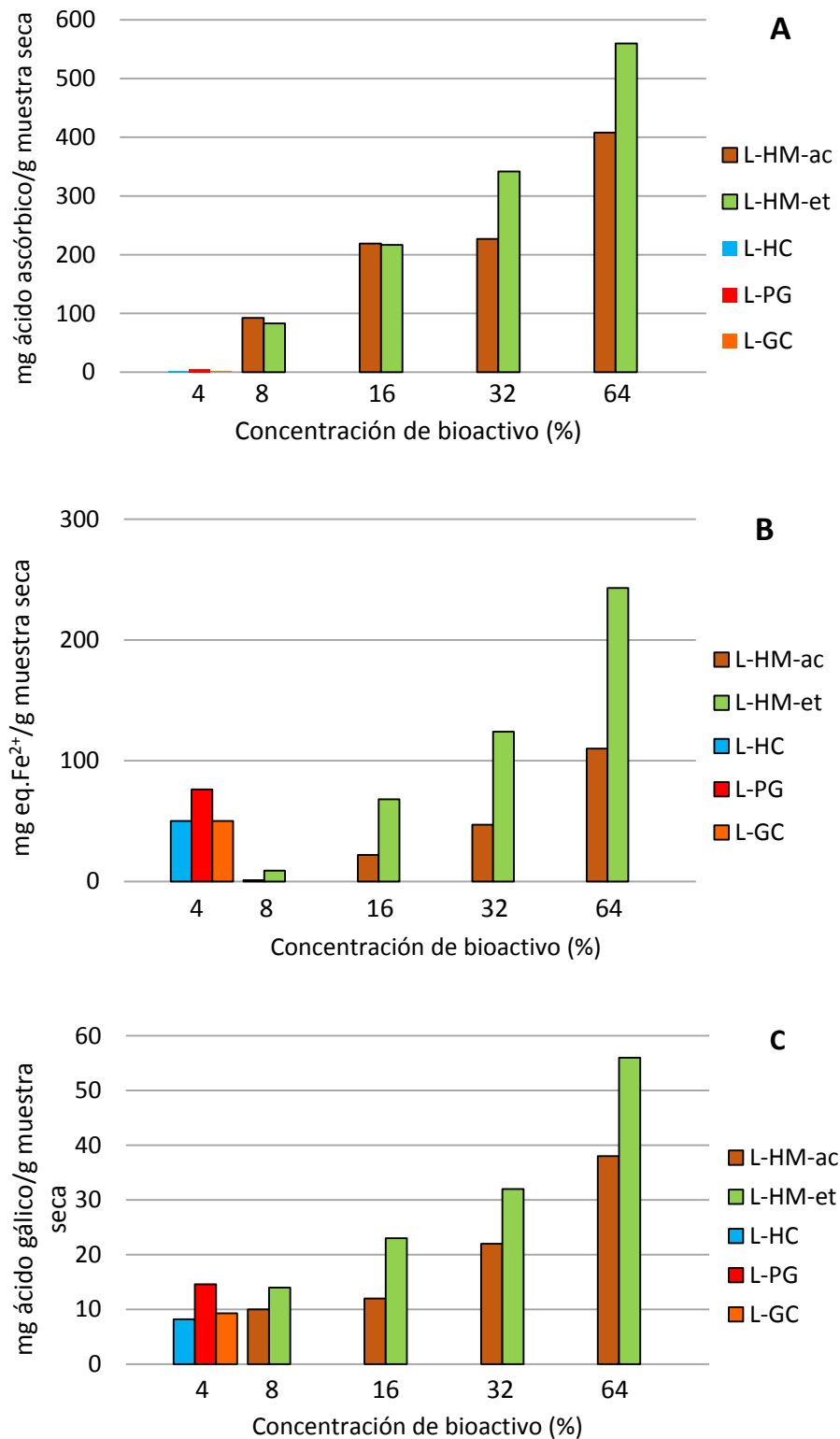


Figura 113. Actividad antioxidante de los liposomas liofilizados rellenos de extractos bioactivos (L-HC, L-PG, L-GC, L-HM-ac y L-HM-et) mediante las técnicas de A) secuestro de radicales libres (ABTS), B) poder reductor del hierro (FRAP) y C) sustancias reactivas al Folin-Ciocalteu.

Estos resultados demostraron, en términos generales, que la actividad antioxidante depende de la concentración de bioactivo, así como de la naturaleza y composición del mismo. Cantidades crecientes de un mismo bioactivo implican una mayor actividad, de tal modo que los liposomas de hinojo marino, tanto acuoso como etanólicos, con 64 % de bioactivo fueron los que presentaron mayor actividad. Por otro lado, el tipo de extracto también influye de manera que todos los liposomas con extractos etanólicos de hinojo tuvieron mayor actividad que sus respectivos liposomas con extractos acuosos, a la misma concentración de bioactivo.

Si estos liposomas de hinojo los comparamos con liposomas incorporando otros bioactivos, el poder antioxidante dependerá de ambos parámetros. Además, la técnica en cuestión también es determinante, ya que en función del bioactivo cuantificará una mayor o menor actividad dependiendo de las interferencias de los extractos con los cromóforos de la técnica. De este modo, mientras los liposomas L-HC, L-PG y L-GC mostraron menor actividad que los de hinojo por secuestro de radicales libres, también tuvieron una mayor actividad que los de hinojo por poder reductor del hierro, a pesar de poseer una menor concentración de bioactivo.

En definitiva, podríamos decir que los liposomas L-HC y L-GC poseen una notable actividad antioxidante, siendo muy similar entre ambos liposomas a pesar de su diferente naturaleza. La actividad de L-HC se atribuye principalmente a su contenido en aminoácidos hidrofóbicos, así como a la relativa elevada cantidad de prolina, mientras que en L-GC se atribuye principalmente a la astaxantina y al tocoferol presentes en el extracto. La actividad de estos liposomas fue inferior a la de los liposomas de hinojo, donde la actividad se incrementa progresivamente con la concentración de bioactivo, siendo superior en los liposomas con el extracto etanólico. En cuanto a los liposomas de piel de granada (L-PG), mostraron una excelente actividad antioxidante (ABTS, FRAP y Folin), siendo incluso superior a la de los liposomas de hinojo con 8 % de bioactivo (ambas actividades atribuidas al diferente contenido polifenólico). Estos resultados indican que, aunque los liposomas de mayor actividad cuantificada fueron L-HM-et 64, los liposomas L-PG tuvieron una mayor actividad potencial que los liposomas de hinojo y, probablemente, liposomas encapsulando concentraciones superiores de PG serían los más antioxidantes, atribuido a la enorme capacidad antioxidante del extracto de piel y albedo de granada.

El análisis multivariante de la mayoría de parámetros estudiados (concentración, tamaño, polidispersidad, potencial zeta, humedad, dispersabilidad, temperatura de transición y actividad antioxidante por métodos ABTS, FRAP y Folin) en los liposomas liofilizados rellenos reflejó varios aspectos interesantes. El análisis discriminante (Figura 114) agrupa los liposomas en función de sus características comunes, reflejando por ejemplo diferencias entre aquellos con 4 % de bioactivo (L-HC, L-PG y L-GC) respecto a los de mayor concentración (L-HM), así como distinciones entre los de mayor y menor concentración de hinojo. Además, dado que el análisis establece que el 100 % de los casos fueron agrupados y clasificados correctamente, se podría decir que incluso los liposomas considerados dentro de un mismo grupo (muy próximos) tienen propiedades características distinguibles del resto, determinando que cada formulación sea única y no reemplazable.

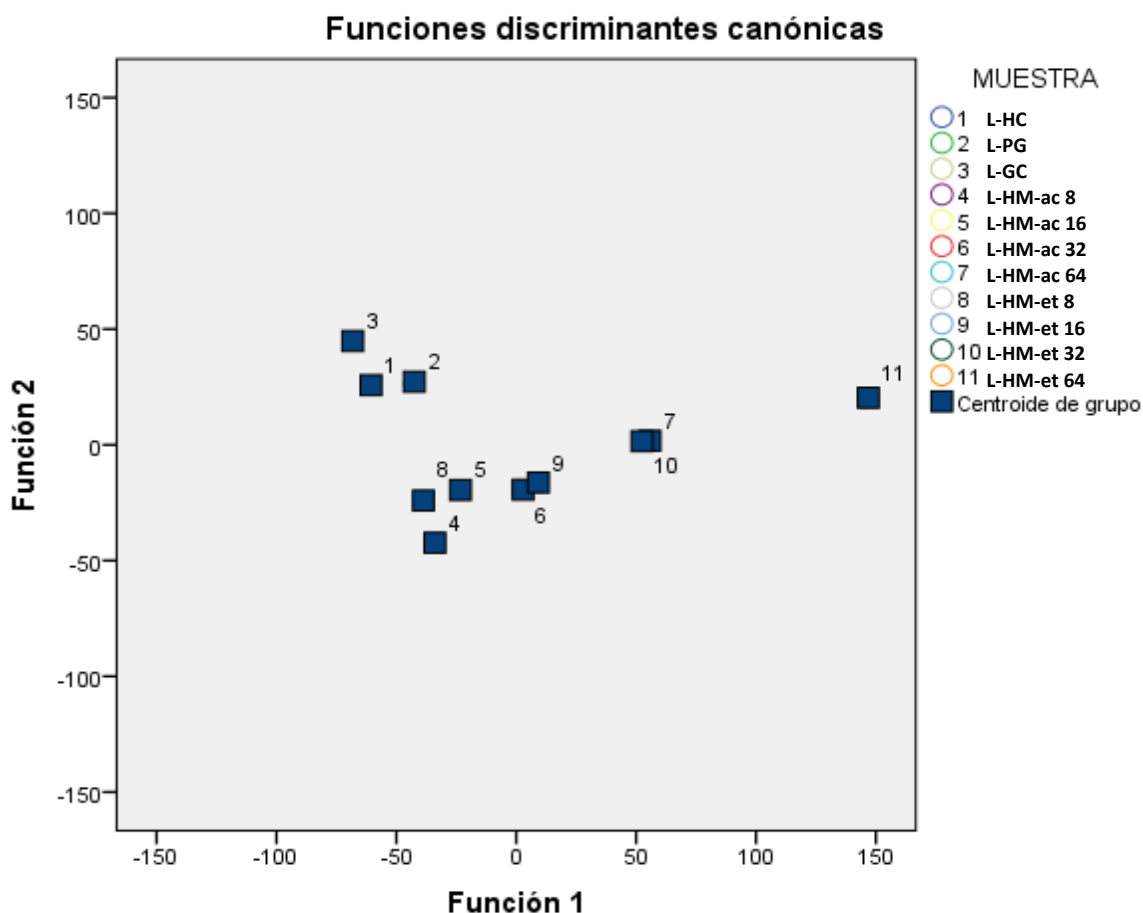


Figura 114. Análisis multivariante (discriminante) de los liposomas liofilizados rellenos.

El análisis factorial (Figura 115; tabla 52) determina la relación e importancia de cada uno de los parámetros estudiados.

Tabla 52. Matriz de componente rotado del análisis multivariante factorial de los liposomas liofilizados rellenos.

| | Componentes | |
|-----------------|----------------|----------------|
| | 1 (48,25 %) | 2 (24,64 %) |
| ABTS | 0,986 | -0,072 |
| FOLIN | 0,976 | 0,039 |
| CONCENTRACIÓN | 0,964 | 0,126 |
| FRAP | 0,850 | 0,182 |
| POTENCIALZ | 0,836 | -0,218 |
| TAMAÑO | -0,181 | 0,918 |
| Tª TRANSICIÓN | 0,123 | 0,870 |
| DISPERSABILIDAD | 0,643 | -0,679 |
| HUMEDAD | -0,042 | -0,582 |
| POLIDISPERSIDAD | 0,146 | 0,162 |

Las actividades antioxidantes (ABTS, FRAP y Folin), la concentración y el potencial zeta están positivamente relacionadas entre sí y constituyen los parámetros de mayor peso en las propiedades finales de las muestras (Tabla 52), con una relación superior a 0,836 respecto a la componente 1 (48,25 % de varianza). La dispersabilidad también está relacionada positivamente con las anteriores, aunque con una relación menor con la componente 1 (0,643). Por el contrario, el tamaño de partícula y la temperatura de transición se relacionan positivamente entre sí y negativamente con la humedad y la dispersabilidad, respecto de la componente 2 (24,64 % de varianza).

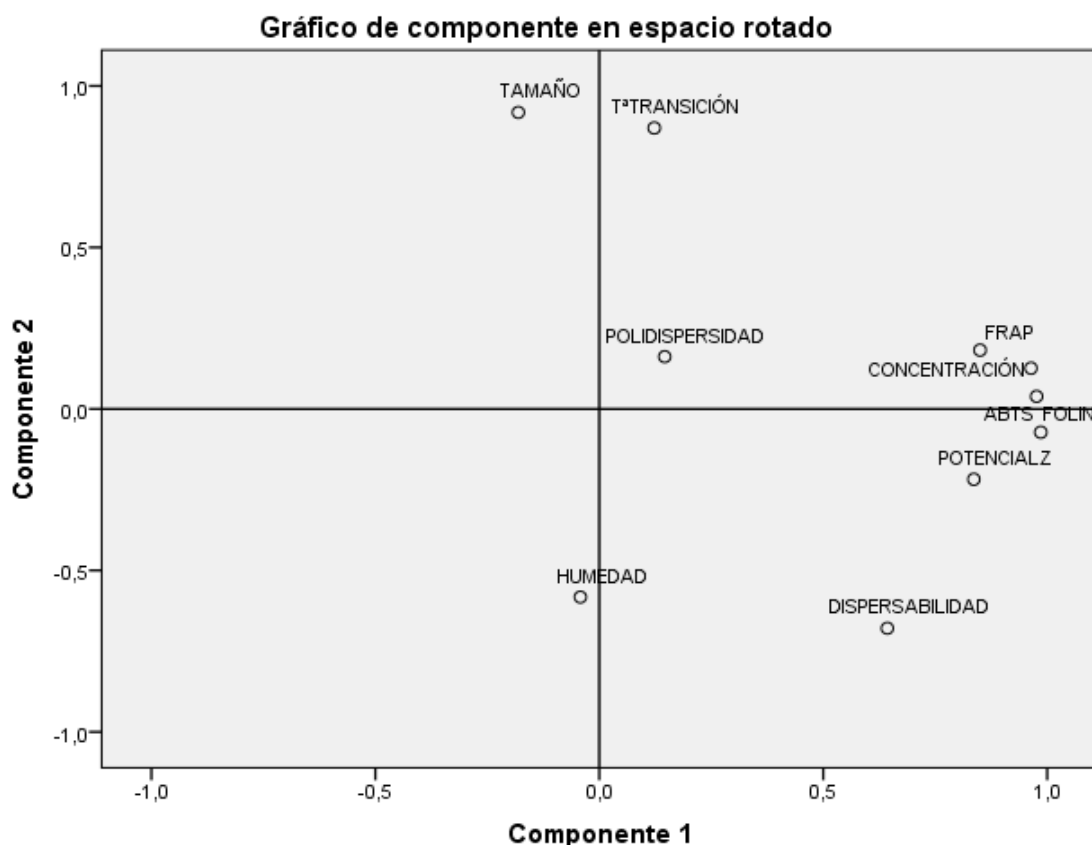


Figura 115. Análisis multivariante (factorial) de los liposomas liofilizados rellenos.

Por tanto, dadas las buenas propiedades estructurales, relativa estabilidad oxidativa y excelentes actividades biológicas, los liposomas liofilizados encapsulando extractos bioactivos poseen aptitudes funcionales adecuadas para poder actuar como productos o ingredientes funcionales de alto valor añadido en la industria alimentaria.

Además, los liposomas liofilizados que contienen extractos polifenólicos (L-PG y L-HM-ac), que son los que han sido estudiados, no muestran efecto citotóxico sobre las células Caco-2 para una concentración de 0,01 mg/mL, con una viabilidad celular que desciende paulatinamente a medida que se aumenta la dosis de exposición (Figura 116). Los liposomas con extracto acuoso de hinojo marino mostraron, a partir precisamente de 0,5 mg/mL, un notable menor efecto citotóxico que los liposomas de piel y albedo de granada, atribuido a la extracción del bioactivo en agua (L-HM-ac) respecto a etanol (L-PG). Por otro lado, los liposomas vacíos presentaron una reducción ligera de la viabilidad celular a partir de concentraciones de 0,1 mg/mL. Estos resultados indican que los liposomas elaborados en este trabajo podrían emplearse en la industria alimentaria dado que no presentan efectos citotóxicos destacables.

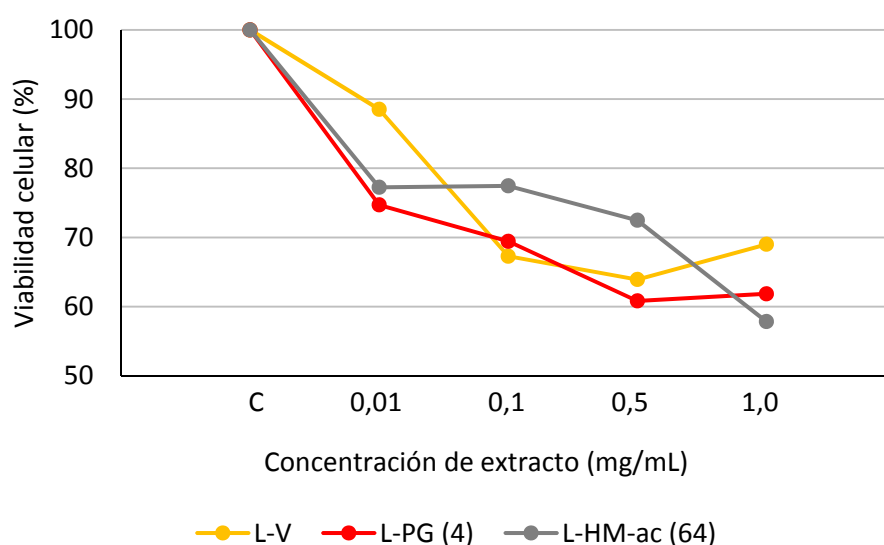


Figura 116. Citotoxicidad, expresada como porcentaje de viabilidad celular, de liposomas liofilizados vacíos (L-V) y encapsulando diferentes extractos bioactivos (L-PG y L-HM-ac 64) a diferentes concentraciones de extracto (valor entre paréntesis).

9.4. Absorción intestinal

Una vez evaluada su aptitud funcional, habría que comprobar si estos liposomas de alto valor añadido con potencial beneficioso para la salud son capaces de atravesar la mucosa intestinal, para ser absorbidos y llegar al órgano diana del organismo. Para ello, se realizó un ensayo de permeabilidad a través de una monocapa de células Caco-2, dejando pasar tanto al extracto acuoso de hinojo marino como al liposoma encapsulando dicho extracto, antes y después de ser digeridos (digestión gastrointestinal *in vitro*). Se eligió el extracto de hinojo debido a que tiene una composición fenólica relativamente simple, en el que se determinó un compuesto mayoritario (el ácido clorogénico), en contraposición con el extracto de piel de granada, que está constituido por multitud de compuestos de intensidades parecidas, resultando ser un extracto bastante complejo. De hecho, los resultados de permeabilidad se expresaron en términos de concentración de ácido clorogénico. Además, se seleccionó expresamente el extracto acuoso por su total ausencia de citotoxicidad (capítulo 2, diseño experimental 8.3.).

Los resultados mostraron que solo una pequeña fracción del ácido clorogénico, tanto del extracto libre como de la fracción libre de la dispersión liposomal, fue capaz de pasar la monocapa de Caco-2. Es bien sabido que los polifenoles no son preferentemente absorbidos a nivel intestinal y tienden a pasar al tracto colónico. Los estudios de dispersión dinámica de luz evidenciaron que no había liposomas en las soluciones, por lo que cabe suponer que los liposomas no han atravesado la monocapa, ya sea entre las células o a través de ellas. Una opción factible sería que los liposomas hubiesen sido invaginados o fagocitados por las células, dada su gran similitud de membranas, pudiendo liberar en cualquier momento el ácido clorogénico, favoreciendo así su absorción. La otra opción es que, al igual que el resto de polifenoles no absorbidos intestinalmente, pasen al colon. Pero no cabe duda de que hay numerosos trabajos que citan el paso de los liposomas a través de la mucosa intestinal, tal y como se indica en la introducción y en el capítulo correspondiente.

Aunque en el colon también puede existir una cierta tasa de absorción, la mayoría de compuestos polifenólicos presentes aquí tienen otras funciones en el organismo, como son mejorar la flora colónica o la formación de otros compuestos más activos y que se absorben

mejor, conocidos como metabotipos (Tomás-Barberán et al., 2016). Al igual que en el intestino, en el colon los liposomas podrían ser capaces tanto de liberar parte del ácido clorogénico encapsulado como de adherirse e invaginarse dentro de las células de la pared del colon (colonocitos). Aun así, son necesarios más ensayos y con mayor detalle para determinar cuál es la función de los liposomas una vez lleguen al tracto intestinal.

9.5. Aplicación de liposomas en reestructurados de pescado

Los liposomas, tanto en su forma fresca (dispersión liposomal) como en estado seco (líoofilizados), permiten su incorporación en matrices alimentarias de diferente naturaleza. En la presente se han ensayado diferentes ejemplos, uno de ellos es su inclusión en el músculo de pescado como ejemplo de miosistema. Su adición en este tipo de matrices da lugar a productos reestructurados de alto valor añadido en el que las vesículas liposomales pueden modificar las características físico-químicas de la matriz resultante y sus propiedades nutricionales y activas, esto último especialmente por las propiedades que los extractos bioactivos encapsulados pueden aportar, confiriendo un valor añadido mayor derivado de sus propiedades funcionales con beneficios para la salud. Del mismo modo, la matriz podría favorecer la estabilidad de los liposomas, mejorando la protección de los bioactivos encapsulados. Las propiedades finales del reestructurado resultante pueden depender de diversos factores: unos intrínsecos a la calidad del músculo, como son el estado de agregación inicial de la proteína muscular o la formulación del homogeneizado, como por ejemplo la presencia de sal; otros propios del liposoma, como el estado de hidratación de los liposomas incorporados o la composición de las formulaciones liposomales; y por último los debidos a las condiciones del proceso de elaboración del reestructurado y tratamientos posteriores del producto.

9.5.1. Importancia del estado de hidratación de los liposomas

En un primer ensayo se diseñaron liposomas de fosfatidilcolina de soja vacíos sometidos a diferentes tratamientos de estabilización: alta presión hidrostática (AP), congelación/descongelación (CD), liofilización (LF) y atomización (A), en combinación algunos de ellos con la adición del crioprotector glicerol (CD-G y LF-G). Un lote de liposomas control sin tratamiento (frescos, F) se estudió en paralelo. Cada una de las formulaciones liposomales se incorporó como ingrediente funcional en músculo de merluza fresco (*Merluccius merluccius*), previamente homogeneizado con sal (NaCl, 1 %), con el objetivo de determinar el efecto de la adición de liposomas en las propiedades ligantes de agua y gelificantes de los homogeneizados de músculo de merluza en función del tipo de tratamiento de estabilización y del estado de hidratación de los liposomas. Con fines comparativos, un lote sin liposomas añadidos (músculo control, MC), también previamente homogeneizado con sal, se estudió en paralelo. Todas estas formulaciones se prepararon con músculo M1. La figura 117 muestra el aspecto del homogeneizado control MC, idéntico visualmente al resto de homogeneizados incorporando liposomas.

La adición de liposomas en el músculo de merluza homogeneizado con sal disminuyó la solubilidad proteica de las masas con respecto al homogeneizado control (MC), induciendo un efecto de agregación de la proteína muscular, siendo más acusado cuando los liposomas fueron incorporados en estado seco. Esta agregación fue consecuencia del menor contenido en agua en las masas que contenían liposomas (menor aún en aquellas con liposomas deshidratados), estableciendo competitividad por las moléculas de agua con las proteínas miofibrilares. Dado que se añadió la misma cantidad de agua en todas las formulaciones y que no existe pérdida de ésta tras la formación del homogeneizado, la cantidad de agua es la misma en todos ellos; sin embargo, su localización es diferente, de modo que podemos deducir que los homogeneizados incorporando liposomas secos están más agregados y tienen menos habilidad para captar el agua añadida en su interior, quedando ésta de manera libre en los intersticios de las células,

siendo más fácilmente liberada durante el procesado y la conservación posterior. Este mayor grado de agregación encontrado para estas formulaciones podría deberse a que los liposomas deshidratados dificultan la adecuada desnaturalización y posterior solubilización del músculo de merluza, dando lugar a estructuras más agregadas.



Figura 117. Fotografía de los homogeneizados de músculo de merluza con sal (1 %).

Por otro lado, el control MC mostró una menor capacidad de ligar agua que las masas con liposomas, hecho observado tanto mediante su capacidad de retención de agua, así como por Resonancia Magnética Nuclear de Protón de Bajo Campo. Este efecto se atribuye a que en las masas que contienen liposomas, las cabezas polares de los fosfolípidos son capaces de atrapar parte del agua (a través de los radicales OH de los grupos fosfato), a pesar de que la estructura en su conjunto esté más agregada (Figura 118). La adición de liposomas deshidratados ocasionó una menor cantidad de agua ligada a estructuras proteicas respecto a la adición de dispersiones frescas, como consecuencia de su menor contenido en agua y el mayor grado de agregación. Hay que mencionar que las formulaciones incorporando glicerol en los liposomas presentaron una mayor capacidad ligante de agua que sus respectivas formulaciones sin glicerol, debido a su gran higroscopicidad, es decir a la capacidad de atrapar agua de los grupos OH de la molécula de glicerol, hecho que confirma la capacidad ligante de las cabezas polares de los fosfolípidos de los liposomas.

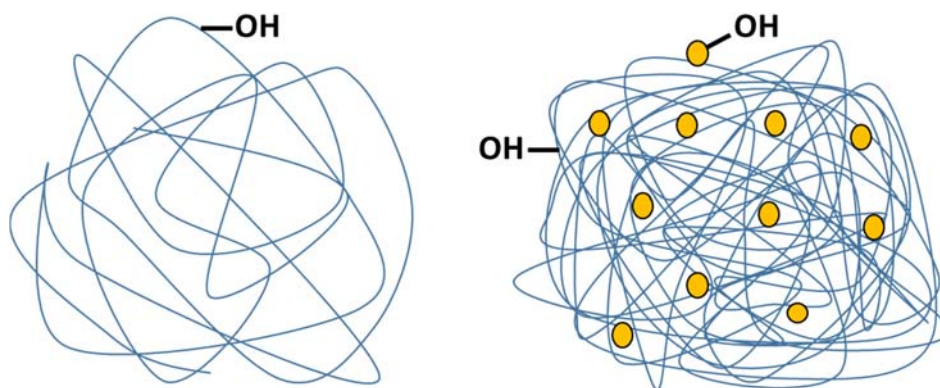


Figura 118. Representación gráfica de la estructura proteica estándar (izquierda) y con la incorporación de liposomas embebidos en la matriz proteica (derecha).

Los homogeneizados formulados con liposomas mostraron temperaturas más altas de desnaturalización y menores valores de entalpía en todas sus transiciones de fase observadas por Calorimetría Diferencial de Barrido, lo que implica la mayor estabilidad térmica tanto de la miosina como de la actina en estas masas. Cuando los liposomas fueron incorporados en estado seco, el incremento de temperatura fue superior en las transiciones asociadas a la actina, indicando que favorecen en mayor grado la estabilidad de la actina respecto a las dispersiones liposomales, sin diferencias para la miosina. Esta mayor estabilidad fue debida al mayor grado de agregación proteica mostrado en los homogeneizados conteniendo liposomas deshidratados, lo que concuerda con los resultados obtenidos en solubilidad proteica.

El comportamiento viscoelástico en función de un barrido de frecuencias reflejó que los liposomas interfirieron con las interacciones proteína-proteína de la matriz muscular creando discontinuidad en ella, lo que disminuyó la estabilidad estructural del homogeneizado resultante, siendo este efecto más acusado en el caso de dispersiones liposomales. Este hecho coincide con la menor consistencia de gel cuantificada para las masas conteniendo liposomas añadidos en forma de dispersión liposomal en comparación con aquellas con liposomas incorporados en forma deshidratada (liposomas secos). Estos resultados se deben a que al añadirse los liposomas en estado líquido (dispersiones) podrían acceder más fácilmente a las cadenas laterales proteicas, produciendo mayor inestabilidad de la matriz muscular, lo que estaría en consonancia con los resultados obtenidos en Resonancia Magnética Nuclear, donde las masas adicionadas con dispersiones liposomales mostraron mayor espacio intramiofibrilar y más capacidad de englobar agua en su interior.

El comportamiento viscoelástico en función de un barrido de temperaturas demostró nuevamente las conclusiones anteriores, donde la adición de liposomas en estado líquido dio lugar a homogeneizados más débiles y de peor estructura, reflejado por un proceso de gelificación térmica más rápido atribuido a su mayor espacio intramiofibrilar y su mayor exposición de los sitios reactivos proteicos, lo que desencadena un mayor grado de discontinuidad de la matriz. En cambio, la adición de liposomas en estado seco permitió la obtención de geles de mejor estructuración que con las dispersiones, aunque igualmente fueron más débiles que los geles control (MC), como consecuencia del mayor grado de agregación proteica encontrado en los homogeneizados incorporando este tipo de liposomas. Las propiedades mecánicas de los geles formulados con liposomas preparados tanto a 60 °C como a 80 °C reflejaron el mismo comportamiento, con diferencias respecto a los resultados obtenidos en reología dinámica oscilatoria (comportamiento viscoelástico), debida al diferente régimen de calentamiento entre ambas técnicas (Figura 119). Dado que todas las masas conteniendo dispersiones liposomales con glicerol (F, AP, CD y CD-G) mostraron en reología una gelificación completa y finalizada a 60 °C, las propiedades mecánicas de los geles (ensayo por texturometría) se estudiaron a esta supuesta máxima temperatura de gelificación (60 °C) y a una temperatura mayor (80 °C) con el objetivo de verificar si el gel experimenta cambios a temperaturas superiores a los 60 °C. Tras analizar los resultados, se demuestra que todos los geles refuerzan su proceso de gelificación desde los 60 °C hasta los 80 °C, momento en el que completan su formación, coincidiendo así con los resultados obtenidos en reología para las masas control y las que contienen liposomas deshidratados.

En resumen, podríamos concluir que la adición de liposomas en el músculo de merluza homogeneizado con sal dio lugar a la obtención de una matriz donde las proteínas miofibrilares se encuentran más agregadas y con menor acceso a las moléculas de agua, pero que en su conjunto presenta mayor capacidad ligante de agua gracias a la presencia de las cabezas polares de los fosfolípidos de los liposomas. Además, éstos indujeron un aumento de la estabilidad térmica de la proteína e interfirieron con la agregación térmica de las proteínas musculares, alterando la estabilidad estructural de la matriz. Esta interferencia fue mayor tras la adición de dispersiones en estado líquido debido a la mayor discontinuidad creada en la matriz. En cambio,

la adición de liposomas en estado seco ocasionó la obtención de estructuras más agregadas, atribuido a una dificultosa desnaturalización y solubilización del músculo, lo que determina menor agua ligada, pero mejor estabilidad térmica. Por tanto, los resultados obtenidos sugieren el posible uso de esta especie de pescado altamente apreciada, la merluza, para el desarrollo de productos de pescado funcionales de alto valor añadido, gracias a la adición de liposomas.

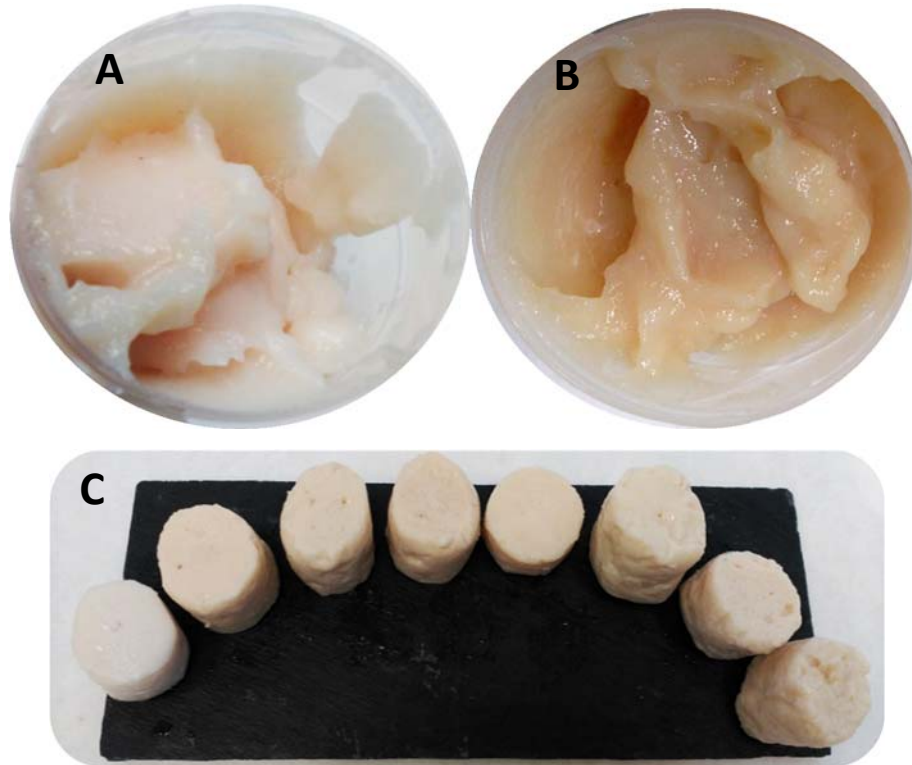


Figura 119. Fotografías de las masas homogeneizadas de músculo de merluza y de los geles. A) Homogeneizado control. B) Homogeneizado con liposomas. C) Geles de músculo de merluza.

9.5.2. Importancia del estado de agregación del músculo y del protector incorporado en los liposomas

Se ha comprobado que el estado de hidratación de liposomas conteniendo glicerol y estabilizados mediante distintos procesos determina las propiedades ligantes de agua y gelificantes de los homogeneizados de músculo de merluza. Sin embargo, estudios posteriores con liposomas estabilizados mediante procesos similares conteniendo trealosa como protector en lugar de glicerol e incorporados en músculo de merluza de menor capacidad funcional de proteína (menor capacidad de retención de agua y menor poder de gelificación), han demostrado que las propiedades de dichos músculos no dependen tanto del estado de hidratación de los liposomas como del estado de conservación de la materia prima (Capítulo 3; diseño experimental 8.6.). Por tanto, las condiciones cambiantes en el presente estudio comparativo (músculo de distinta calidad proteica y diferente protector de vesículas) serían las determinantes en las propiedades de los homogeneizados. Estos resultados sugieren, tal y como adelantábamos, que existen diversos factores que pueden condicionar las propiedades físicas y estructurales de las matrices alimentarias enriquecidas con compuestos bioactivos.

Con la finalidad de estudiar la importancia de algunos de estos parámetros mencionados sobre las propiedades de la proteína muscular, se han comparado masas de músculo de merluza (*Merluccius merluccius*), previamente homogeneizado con sal (NaCl, 1 %), de distinto grado de agregación proteica inicial (que llamaremos MC 1, de alta calidad funcional y MC 2, de baja

calidad funcional), formuladas con liposomas sometidos a diferentes tratamientos de estabilización (CD: congelación-descongelación y LF: liofilización) y con distinta composición de protector de vesículas (G: glicerol o T: trealosa). De este modo, se compararon 6 homogeneizados de músculo de merluza incorporando liposomas: MC 1, CD-G y LF-G (formulaciones M1), y MC 2, CD-T y LF-T (formulaciones M2). De esta forma estudiaremos el efecto de la adición de liposomas en las propiedades ligantes de agua y gelificantes de homogeneizados de merluza, valorando la influencia de los siguientes factores: el estado de agregación inicial de la proteína muscular (comparando entre formulaciones M1 y M2) y el tipo de crio-/lioprotector añadido en la formulación liposomal (comparando entre glicerol y trealosa), teniendo en cuenta que el estado de hidratación fue hallado importante para las formulaciones M1 (liposomas con glicerol) pero no tanto en las formulaciones M2 (liposomas con trealosa).

Como ya se vio en apartados anteriores, la adición de liposomas en el músculo de merluza solubilizado con sal incrementó considerablemente ($p \leq 0,05$) la capacidad de retención de agua de los homogeneizados con respecto al homogeneizado control correspondiente, favorecido por la capacidad de los grupos fosfato de los fosfolípidos de los liposomas de unir agua. El homogeneizado control MC 1 mostró una mayor ($p \leq 0,05$) capacidad de retención de agua que el homogeneizado control MC 2 (Tabla 53), alrededor de un 10 % más, confirmando que MC 2 presenta una estructura proteica más agregada respecto a MC 1. Sin embargo, los homogeneizados que incorporan liposomas con trealosa como protector mostraron valores similares ($p > 0,05$) a aquellos que incorporan liposomas con glicerol, indicando por un lado que, *a priori*, el tipo de protector no parece influir en la capacidad ligante de agua de los homogeneizados, y por otro, que, a pesar de las diferencias del estado inicial de la proteína del músculo, la adición de liposomas permite incrementar la capacidad de retención de agua hasta valores parecidos comprendidos entre 83,8-92,1 % (Tabla 53), eliminando las diferencias atribuibles a la diferente funcionalidad proteica de los músculos.

Tabla 53. Capacidad de retención de agua, expresada como porcentaje (%), de los homogeneizados de merluza con sal control (MC 1 y MC 2) y formulados con liposomas (CD-G: congelado-descongelado con glicerol; LF-G: liofilizado con glicerol; CD-T: congelado-descongelado con trealosa; LF-T: liofilizado con trealosa). Diferentes letras (a, b, c) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre homogeneizados con un mismo tipo de músculo y (x, y) en la misma fila entre homogeneizados sometidos a un mismo tratamiento.

| Capacidad de retención de agua (%) | | | |
|------------------------------------|---------------------------------|------|---------------------------------|
| MC 1 | 69,13 \pm 4,20 ^{a/x} | MC 2 | 57,26 \pm 2,44 ^{a/y} |
| CD-G | 92,12 \pm 1,75 ^{c/x} | CD-T | 90,27 \pm 1,86 ^{b/x} |
| LF-G | 83,78 \pm 2,52 ^{b/x} | LF-T | 85,88 \pm 1,73 ^{b/x} |

La Resonancia Magnética Nuclear de Protón de Bajo Campo (Figura 120; tabla 54) confirmó los resultados anteriores. Los resultados reflejaron que la adición de liposomas disminuye las pérdidas de agua y aumenta la cantidad de la misma unida a estructuras proteicas altamente organizadas (mayor amplitud y tiempo de retención de T_{21} junto con una menor amplitud y mayor tiempo de retención de T_{22} con respecto a los homogeneizados control).

El homogeneizado control MC 1 también presentó menores pérdidas de agua que el homogeneizado control MC 2 (Figura 120A y 120C), reflejado por más agua unida a estructuras dentro de las miofibrillas (mayor amplitud y tiempo de retención de T_{21}) y menos agua fuera de ellas (menor amplitud de T_{22}), indicando que la masa MC 2 experimenta mayor intercambio de protones ^1H con mayores pérdidas de agua. Además, MC 2 no presentó pico T_{2b1} (Figura 120B y 120D), asociado al agua unida fuertemente a macromoléculas, lo que apoya los resultados

anteriores asociados a los picos T_{21} y T_{22} . A pesar de las notables diferencias entre MC 1 y MC 2, cuando se incorporaron los correspondientes liposomas en estos músculos de merluza no se observaron diferencias (salvo alguna excepción) entre formulaciones M1 y formulaciones M2 (Tabla 54), tal y como sucedía con la capacidad de retención de agua. Estos resultados parecen indicar que la adición de liposomas es capaz de suplir las diferencias encontradas en la capacidad ligante de agua de los homogeneizados con distinta funcionalidad proteica inicial, sin poder establecerse diferencias entre liposomas con glicerol y liposomas con trealosa.

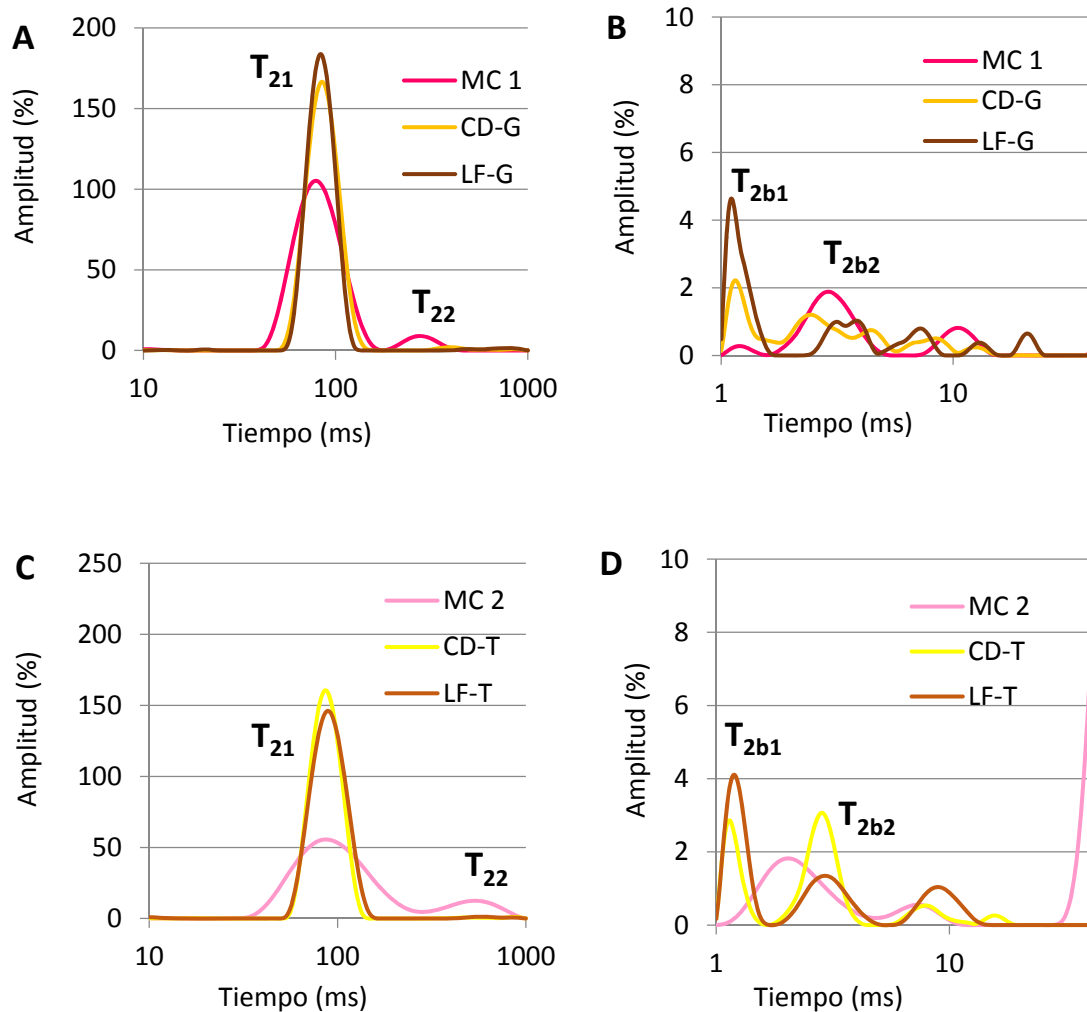


Figura 120. Curvas de distribución de tiempos de relajación T2 analizados mediante Resonancia Magnética Nuclear de Protón de Bajo Campo de los homogeneizados de merluza con sal control (MC 1 y MC 2) y formulados con liposomas (CD-G: congelado-descongelado con glicerol; LF-G: liofilizado con glicerol; CD-T: congelado-descongelado con trealosa; LF-T: liofilizado con trealosa). A) Picos T_{21} y T_{22} de formulaciones con M1. B) Picos T_{2b1} y T_{2b2} de formulaciones con M1. C) Picos T_{21} y T_{22} de formulaciones con M2. D) Picos T_{2b1} y T_{2b2} de formulaciones con M2.

Tabla 54. Parámetros de tiempo (ms) y amplitud (%) de los picos de relajación T2 analizados mediante Resonancia Magnética Nuclear de Protón de Bajo Campo de los homogeneizados de merluza con sal control (MC 1 y MC 2) y formulados con liposomas (CD-G: congelado-descongelado con glicerol; LF-G: liofilizado con glicerol; CD-T: congelado-descongelado con trealosa; LF-T: liofilizado con trealosa). Diferentes letras (a, b, c) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre homogeneizados. A) Tiempo de formulaciones M1. B) Amplitud de formulaciones M1. C) Tiempo de formulaciones M2. D) Amplitud de formulaciones M2.

| A | Tiempo (ms) | | | | |
|------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|
| | T2 (1) | T2 (2) | T2 (3) | T2 (4) | T2 (5) |
| MC 1 | 1,0 ± 0,0 ^a | 2,7 ± 0,6 ^a | 10,0 ± 0,0 ^a | 77,8 ± 1,6 ^a | 273,3 ± 11,6 ^a |
| CD-G | 1,2 ± 0,2 ^b | 4,1 ± 2,2 ^a | 10,5 ± 2,1 ^a | 84,0 ± 0,5 ^b | 557,5 ± 211,7 ^b |
| LF-G | 1,2 ± 0,1 ^b | 4,3 ± 1,9 ^a | 13,3 ± 7,5 ^a | 82,7 ± 1,1 ^b | 685,0 ± 139,9 ^b |

| B | Amplitud (%) | | | | |
|------|------------------------|------------------------|-------------------------|---------------------------|------------------------|
| | A (1) | A (2) | A (3) | A (4) | A (5) |
| MC 1 | 1,0 ± 0,0 ^a | 2,0 ± 0,0 ^a | 2,0 ± 0,0 ^{ab} | 105,3 ± 7,4 ^a | 9,0 ± 4,0 ^a |
| CD-G | 2,3 ± 1,3 ^a | 3,0 ± 0,8 ^a | 1,5 ± 0,7 ^a | 166,5 ± 24,3 ^b | 3,3 ± 1,0 ^b |
| LF-G | 5,8 ± 2,2 ^b | 2,5 ± 1,3 ^a | 2,3 ± 0,6 ^b | 184,0 ± 16,4 ^b | 3,3 ± 1,0 ^b |

| C | Tiempo (ms) | | | | |
|------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|
| | T2 (1) | T2 (2) | T2 (3) | T2 (4) | T2 (5) |
| MC 2 | - | 2,1 ± 0,3 ^a | 7,0 ± 1,0 ^a | 85,4 ± 3,0 ^a | 491,3 ± 16,5 ^a |
| CD-T | 1,2 ± 0,1 ^a | 2,7 ± 0,5 ^{ab} | 10,5 ± 3,9 ^a | 85,2 ± 0,6 ^a | 705,0 ± 183,8 ^a |
| LF-T | 1,2 ± 0,1 ^a | 3,5 ± 0,6 ^b | 9,3 ± 1,5 ^a | 87,7 ± 0,2 ^a | 665,0 ± 153,5 ^a |

| D | Amplitud (%) | | | | |
|------|------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | A (1) | A (2) | A (3) | A (4) | A (5) |
| MC 2 | - | 2,0 ± 0,0 ^a | 1,0 ± 0,0 ^a | 55,8 ± 3,5 ^a | 11,8 ± 1,5 ^a |
| CD-T | 2,8 ± 1,0 ^a | 3,5 ± 1,3 ^a | 1,0 ± 0,8 ^a | 160,5 ± 5,8 ^c | 2,3 ± 0,5 ^b |
| LF-T | 3,8 ± 1,5 ^a | 2,0 ± 1,2 ^a | 1,5 ± 0,6 ^a | 145,8 ± 9,4 ^b | 2,0 ± 0,0 ^b |

El perfil electroforético de la fracción soluble de los homogeneizados mostró que, independientemente del tipo de preparación liposomal añadida al músculo homogeneizado con sal, las proteínas miofibrilares se solubilizaron de un modo similar (cualitativamente) cuando se comparan entre homogeneizados formulados con un mismo tipo de músculo (Figura 121), descartándose en esta fracción la presencia de interacciones proteína-lípido entre matriz y liposomas.

Cuando comparamos entre homogeneizados control, observamos que MC 1 y MC 2 fueron muy diferentes entre sí con una funcionalidad proteica completamente distinta. En contraste a MC 1, la fracción soluble de la masa MC 2 no presentó banda para la miosina, indicando que esta proteína pasó a formar parte de la fracción insoluble, y por tanto no se muestra en este perfil, corroborando el elevado grado de agregación inicial de dicho músculo. Del mismo modo, la actina, aunque presente también en MC 2, mostró una intensidad de banda mucho menor, reflejando que parte de esta proteína también fue insolubilizada, confirmando la baja calidad proteica de MC 2 en comparación con MC 1. En este caso, la incorporación de liposomas en las masas homogeneizadas con sal no consiguió mejorar notoriamente el estado de agregación del

músculo. Dada la enorme diferencia entre ambas proteínas musculares (MC 1 y MC 2), se hizo imposible la comparación entre formulaciones con glicerol y formulaciones con trealosa.

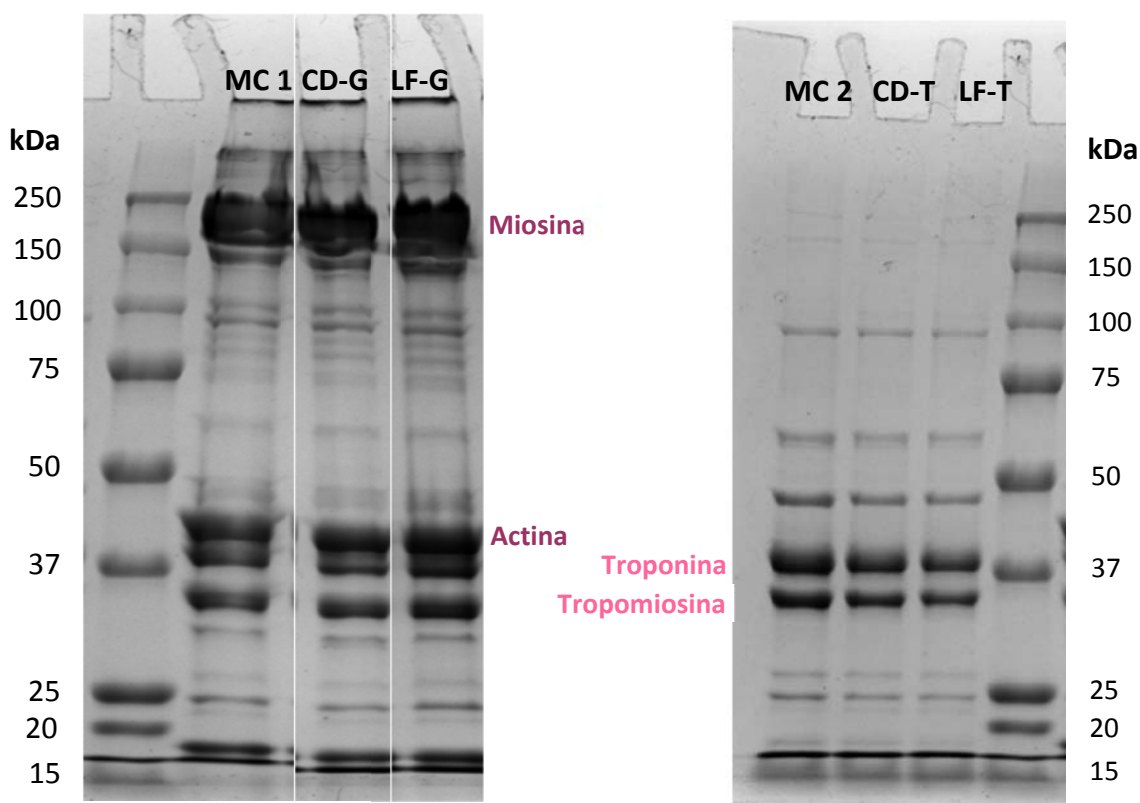


Figura 121. Perfil electroforético mediante SDS-PAGE de la fracción soluble de los homogeneizados de merluza con sal control (MC 1 y MC 2) y formulados con liposomas (CD-G: congelado-descongelado con glicerol; LF-G: liofilizado con glicerol; CD-T: congelado-descongelado con trealosa; LF-T: liofilizado con trealosa). Izquierda: formulaciones con M1. Derecha: formulaciones con M2.

La dispersión dinámica de luz en Zetasizer permitió cuantificar la distribución de tamaños de partícula de los agregados proteicos solubles de los homogeneizados no evidenciados en el estudio electroforético (Figura 122).

No se apreciaron diferencias en la distribución de tamaños de los agregados entre MC 1 y MC 2, presentando ambas masas una distribución bimodal con una población de menor tamaño minoritaria y otra de mayor tamaño mayoritaria. La población minoritaria mostró su pico a ≈ 164 nm en ambas masas, atribuido a la molécula de miosina en su forma monomérica, que presenta precisamente una longitud similar. Sin embargo, la población mayoritaria, que refleja agregados proteicos solubles de tamaño medio, fue diferente entre homogeneizados control, mostrando un mayor tamaño medio para MC 1 (825 nm; figura 122A) que para MC 2 (531 nm; figura 122B), corroborando un mayor estado de agregación del músculo MC 2, dado que los agregados de mayor tamaño han ido migrando hacia la fracción insoluble. Cuando los liposomas fueron incorporados en los homogeneizados, el perfil de distribución de tamaños no se vio modificado en los homogeneizados conteniendo liposomas con trealosa con respecto a su control (distribuciones bimodales con tamaños medios de agregados solubles similares), pero sí en aquellos incorporando liposomas con glicerol (distribuciones trimodales) con respecto al suyo. Estos resultados sugieren que la presencia de trealosa en los liposomas permite mantener estable el tamaño de los agregados proteicos de los homogeneizados de músculo de merluza, no así la presencia de glicerol. Estas diferencias se atribuyen al mayor estado general de agregación proteica en MC 2, y también a las diferencias moleculares entre ambos crioprotectores, que pueden condicionar su localización e interacción con los liposomas.

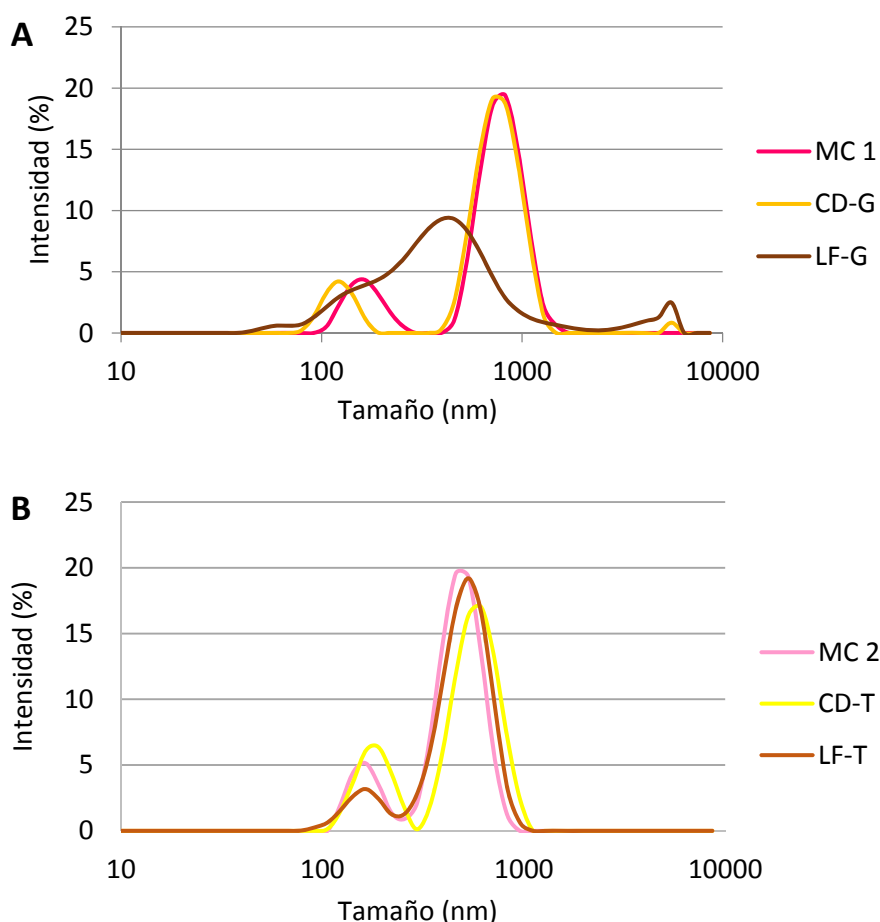


Figura 122. Distribución de tamaños de agregados de la fracción soluble de los homogeneizados de merluza con sal control (MC 1 y MC 2) y formulados con liposomas (CD-G: congelado-descongelado con glicerol; LF-G: liofilizado con glicerol; CD-T: congelado-descongelado con trealosa; LF-T: liofilizado con trealosa). A) Formulaciones con M1. B) Formulaciones con M2.

El potencial zeta de los agregados proteicos de la fracción soluble de los homogeneizados mostró grandes diferencias entre MC 1 (-20,8 mV) y MC 2 (-0,8 mV) (Tabla 55).

Tabla 55. Potencial Z (mV) de la fracción soluble de homogeneizados de merluza con sal control (MC 1 y MC 2) y formulados con liposomas (CD-G: congelado-descongelado con glicerol; LF-G: liofilizado con glicerol; CD-T: congelado-descongelado con trealosa; LF-T: liofilizado con trealosa). Diferentes letras (a, b, c) en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre homogeneizados con un mismo tipo de músculo y (x, y) en la misma fila entre homogeneizados sometidos a un mismo tratamiento.

| Potencial Z (mV) | | | |
|------------------|-----------------------|------|-----------------------|
| MC 1 | $-20,8 \pm 1,4^{a/x}$ | MC 2 | $-0,8 \pm 0,4^{a/y}$ |
| CD-G | $-19,5 \pm 0,0^{a/x}$ | CD-T | $-29,0 \pm 3,7^{c/y}$ |
| LF-G | $-21,2 \pm 2,7^{a/x}$ | LF-T | $-10,7 \pm 0,1^{b/y}$ |

El menor potencial de MC 2 se atribuye al elevado grado de agregación proteica del músculo de merluza empleado, que dificulta la desprotonación de los aminoácidos ácidos durante el proceso de homogeneización con sal, dando lugar a un potencial mucho menos electronegativo que MC 1. La adición de liposomas en los homogeneizados no modificó los valores de potencial zeta cuando los liposomas incorporaban glicerol, dadas las repulsiones electrostáticas que tienen lugar entre los grupos carboxilo de las proteínas y los grupos fosfato de los liposomas,

que mantienen estable el potencial zeta. En cambio, en los homogenizados M2, con un mayor grado de agregación y muy bajo potencial Z, la presencia de liposomas con trealosa tornó el potencial zeta más electronegativo en función del tipo de tratamiento/estado de hidratación de los liposomas, siendo más electronegativo en CD-T, probablemente debido a que al incorporarse en los homogeneizados con sal en forma líquida penetra mejor e interacciona más directamente con las cadenas laterales de las proteínas musculares. El mayor potencial electronegativo en estos homogeneizados con liposomas se atribuye a la presencia de los grupos cargados negativamente de los liposomas (grupos fosfato). Por tanto, las diferencias observadas entre formulaciones M1 y M2 (incluyendo los homogeneizados que contienen liposomas) se atribuyen directamente a la diferente calidad funcional del músculo de merluza de partida.

Todos los homogeneizados, tanto controles (homogeneizados de músculo MC 1 y MC 2) como incorporando liposomas a estas formulaciones, presentaron un comportamiento viscoelástico tipo gel, reflejado por un mayor valor de G' respecto a G'' en todas las masas sometidas a un barrido de frecuencias a temperatura constante (Figura 123).

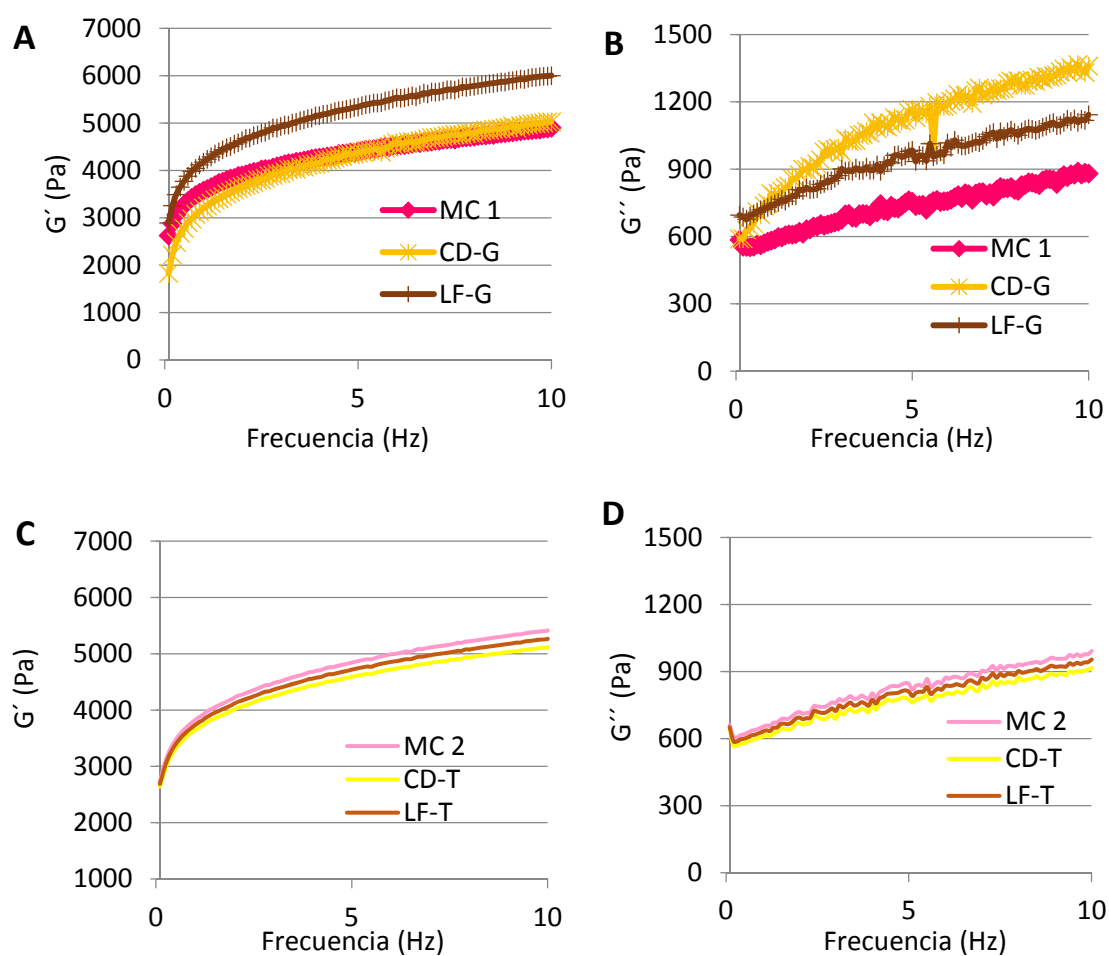


Figura 123. Espectros mecánicos en función de un barrido de frecuencias desde 0,1-10 Hz a temperatura constante de 10 °C de los homogeneizados de merluza con sal control (MC 1 y MC 2) y formulados con liposomas (CD-G: congelado-descongelado con glicerol; LF-G: liofilizado con glicerol; CD-T: congelado-descongelado con trealosa; LF-T: liofilizado con trealosa). A) Módulo elástico (G') de formulaciones con M1. B) Módulo viscoso (G'') de formulaciones con M1. C) Módulo elástico (G') de formulaciones con M2. D) Módulo viscoso (G'') de formulaciones con M2.

El homogeneizado MC 1 mostró una mayor consistencia de gel a condiciones de temperatura 10 °C y frecuencia 1 Hz que el homogeneizado MC 2, representado por un valor superior de G'_0

(Tabla 56). Del mismo modo, las masas conteniendo liposomas de formulación MC 1 tuvieron mayores valores de G_0' y, por tanto, mayor consistencia de gel que aquellas conteniendo liposomas de formulación MC 2. Estos resultados confirman la baja funcionalidad de la proteína muscular de las masas MC 2, fenómeno que da lugar a la formación de estructuras menos organizadas en las formulaciones elaboradas a partir de este tipo de músculo. En términos generales, se aprecia una tendencia de incremento de G_0' en las formulaciones con liposomas respecto a su control sin ellos, con la excepción de CD-G. Este aumento fue en ambos casos, formulaciones M1 y M2, superior para los músculos que incorporan liposomas liofilizados, siendo únicamente significativo ($p \leq 0,05$) el incremento para LF-T respecto a MC 2.

Tabla 56. Parámetros viscoelásticos de G_0' (Pa), obtenido del valor a 1 Hz en el barrido de frecuencias, y n' , obtenido del ajuste del módulo elástico del espectro mecánico a la ley de la potencia, de los homogeneizados de merluza con sal control (MC 1 y MC 2) y formulados con liposomas (CD-G: congelado-descongelado con glicerol; LF-G: liofilizado con glicerol; CD-T: congelado-descongelado con trealosa; LF-T: liofilizado con trealosa). A) Formulaciones con M1. B) Formulaciones con M2. Diferentes letras (a, b) indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre homogeneizados con un mismo tipo de músculo y (x, y) entre homogeneizados sometidos a un mismo tratamiento.

| | G_0' (Pa) | n' |
|------|--------------------------|-------|
| MC 1 | $3567,7 \pm 97,6^{ab/x}$ | 0,134 |
| CD-G | $3158,2 \pm 79,5^a/x$ | 0,203 |
| LF-G | $4172,5 \pm 336,1^{b/x}$ | 0,156 |
| MC 2 | $2034,3 \pm 138,2^a/x$ | 0,157 |
| CD-T | $2655,7 \pm 44,4^{ab/y}$ | 0,185 |
| LF-T | $3645,6 \pm 545,4^{b/x}$ | 0,161 |

El modelo de la ley de la potencia se ha utilizado para describir las propiedades de flujo de muchos fluidos. En el valor de n' se puede apreciar una gran estabilidad estructural de los homogeneizados. Además, se aprecia la misma tendencia en ambas formulaciones: la adición de liposomas incrementa el valor de n' (disminuyendo la estabilidad) respecto al control, demostrando que su presencia modifica la estabilidad estructural de las masas homogeneizadas con sal, siendo esta variación más acusada en los homogeneizados conteniendo liposomas sometidos a congelación/descongelación, reflejando que las masas adicionadas con liposomas en estado liofilizado presentan una estructura más estable que aquellas conteniendo liposomas en estado líquido.

El homogeneizado control MC 1 (menor valor de n') presentó una mayor estabilidad estructural que MC 2, corroborando la distinta calidad y funcionalidad proteica observada entre ambos músculos de merluza. Sin embargo, cuando se incorporaron los liposomas en los homogeneizados no hubo diferencias entre formulaciones, no encontrándose una relación apreciable en función del tipo de protector añadido.

Los perfiles de gelificación térmica de la proteína de los homogeneizados de músculo de merluza (Figura 124) se caracterizaron por una primera desestabilización proteica a $\approx 27-30$ °C como consecuencia de la rotura de enlaces por puentes de hidrógeno sensibles al calor. Este efecto promovió el desplegamiento de la proteína, dando lugar a una mayor exposición de sus sitios reactivos, hecho necesario para la subsecuente formación de enlaces intermoleculares. Así, en torno a $\approx 38-42$ °C tuvo lugar el fenómeno de asentamiento o “setting”, proceso por el que se forma una primera red proteica ordenada estabilizada mediante interacciones hidrofóbicas y enlaces covalentes ϵ -(γ -glutamil)-lisina inducidos por la actividad transglutaminasa endógena. Posteriormente, tuvo lugar el fenómeno de modori a ≈ 46 °C, caracterizado por la desintegración de la red proteica como consecuencia de la activación de proteasas estables al calor. Finalmente, nuevos enlaces intermoleculares tuvieron lugar en la matriz hasta la formación de la red proteica

final (conocida como gel) en torno a $\approx 80^\circ\text{C}$, basada en interacciones hidrofóbicas y enlaces covalentes disulfuro termoestables intra- e intermoleculares. Destacar que en mitad de este último proceso se detectó una fase de reordenamiento en torno a $\approx 65^\circ\text{C}$, a partir de la cual se produce un reforzamiento del gel por el predominio de la formación de enlaces disulfuro.

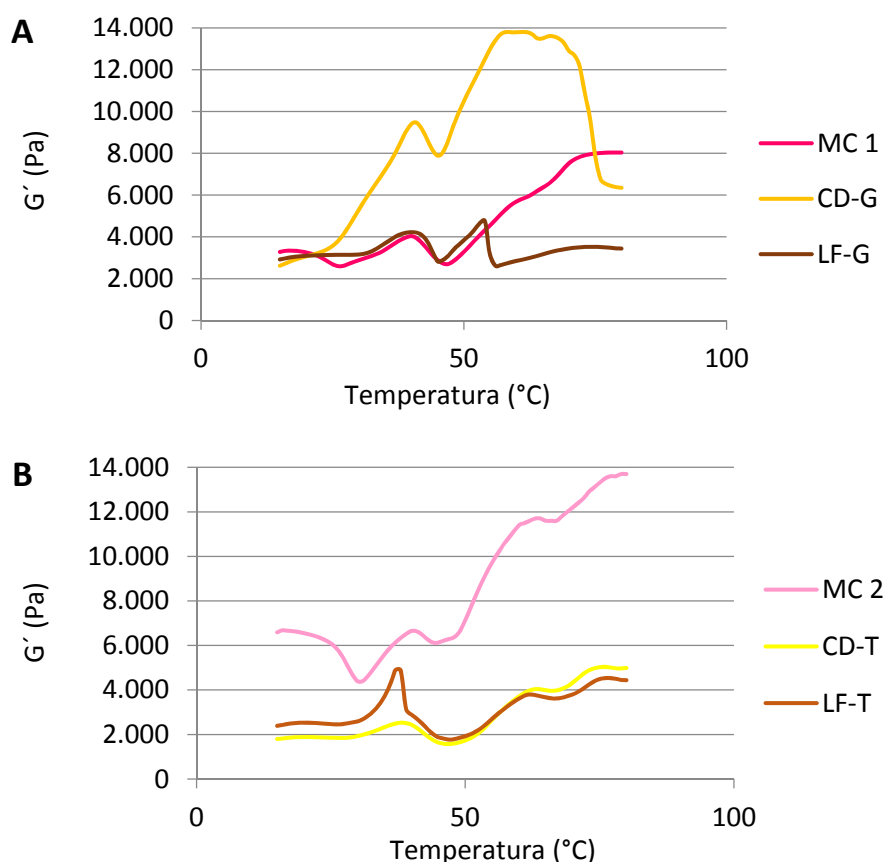


Figura 124. Comportamiento viscoelástico, expresado como módulo elástico (G' , Pa), en función de un barrido de temperatura desde 15°C hasta 80°C a frecuencia constante de 1 Hz, de los homogeneizados de merluza con sal control (MC 1 y MC 2) y formulados con liposomas (CD-G: congelado-descongelado con glicerol; LF-G: liofilizado con glicerol; CD-T: congelado-descongelado con trealosa; LF-T: liofilizado con trealosa). A) Formulaciones con M1. B) Formulaciones con M2.

Las masas control (MC 1 y MC 2) presentaron temperaturas muy similares para todos los eventos térmicos descritos, sin embargo, MC 2 mostró en todos ellos un mayor valor de G' que MC 1, incluyendo el momento de partida a 15°C y el momento de formación final del gel a 80°C . Estos resultados se deben al mayor grado de agregación proteica del músculo MC 2 en comparación con MC 1.

Cuando se incorporaron los liposomas en los homogeneizados con sal, el comportamiento térmico de las masas fue parecido entre todas ellas, con la excepción de CD-G, que mostró valores muy superiores de G' , atribuido al estado de hidratación de los liposomas (líquidos) y al menor grado de agregación del músculo MC 1. Es muy significativo destacar cómo a partir de la masa elaborada con M2 y adicionando los liposomas se obtiene un perfil similar al de la masa M1, lo que se atribuye a que los liposomas son capaces de interrumpir en el agregado favoreciendo su disociación.

Las propiedades mecánicas de los geles obtenidos a partir de los homogeneizados de músculo de merluza con sal y diferentes liposomas añadidos (Figura 125) reflejaron que los geles, al menos los que contenían liposomas con glicerol, continuaban su proceso de gelificación térmica

desde los 60 °C hasta los 80 °C (Figura 125A), momento en el que alcanzan el estado de red proteica organizada termoestable, hecho que coincide con los resultados obtenidos en reología dinámica oscilatoria (Figura 124). La única excepción fue el gel CD-G que completaba su gelificación en torno a los 60 °C, tal y como se observa en los estudios reológicos, debido a, como ya explicamos en el capítulo 3 (Diseño experimental 8.5.), el diferente régimen de calentamiento entre ambas técnicas junto con la formulación característica de dicho gel.

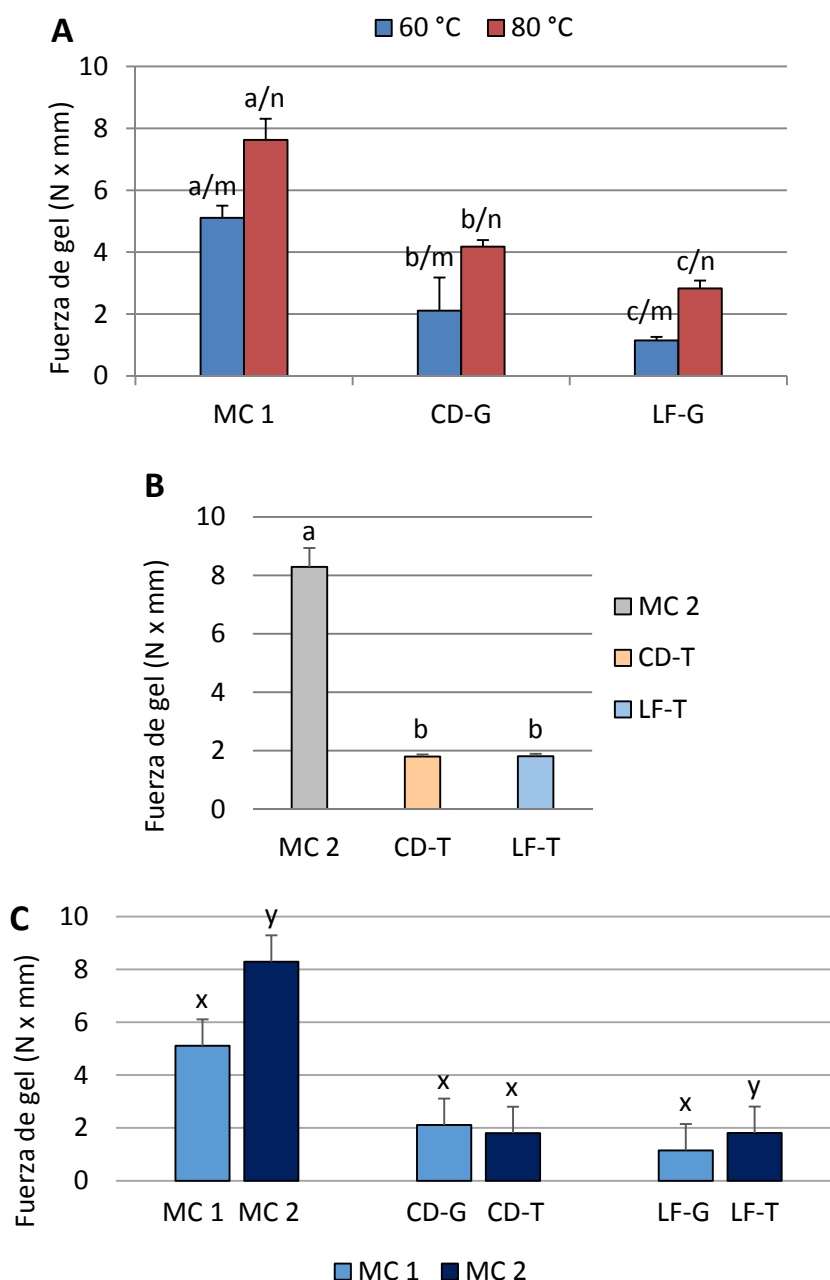


Figura 125. Propiedades mecánicas, expresadas como fuerza de gel (N x mm), de los geles de merluza control (MC 1 y MC 2) y formulados con liposomas (CD-G: congelado-descongelado con glicerol; LF-G: liofilizado con glicerol; CD-T: congelado-descongelado con trealosa; LF-T: liofilizado con trealosa). A) Formulaciones con M1 preparadas a 60 °C y 80 °C. B) Formulaciones con M2 preparadas a 60 °C. C) Formulaciones con M1 y M2 preparadas a 60 °C. Diferentes letras (a, b, c) indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre geles con un mismo tipo de músculo y preparados a una misma temperatura; (m, n) entre geles M1 con un mismo tratamiento; (x, y) entre geles M1 y M2, a igual tratamiento y temperatura.

En ambas formulaciones (MC 1 y MC 2), la adición de liposomas en los homogeneizados de merluza dio lugar a la formación de geles más débiles en comparación con los geles control sin liposomas, resultados que concuerdan con los obtenidos en reología dinámica oscilatoria. Además, también coincide el hecho de que el gel control MC 2 presentó una mayor fuerza de gel que el control MC 1, indicando que la proteína del músculo MC 2 se encuentra inicialmente más agregada.

La incorporación de liposomas en los homogeneizados de merluza con sal desembocó en comportamientos distintos en los geles obtenidos cuando se añaden liposomas liofilizados con glicerol o con trealosa (LF-G y LF-T) ($p \leq 0,05$) pero no cuando se añaden congelados (CD-G y CD-T), atribuyendo estas diferencias a la diferente calidad proteica del músculo (MC 1 y MC 2) y a la presencia de los distintos protectores en la formulación liposomal (glicerol y trealosa) cuando están liofilizados.

En resumen, MC 2 presentó menos agua ligada a estructuras proteicas, las proteínas miosina y actina desnaturalizadas e insolubilizadas total y parcialmente, respectivamente, agregados proteicos solubles de menor tamaño con potencial zeta menos electronegativo, peor estabilidad estructural y geles más débiles con menor organización estructural, lo que se atribuye a un mayor estado de agregación inicial de su proteína y una peor calidad y funcionalidad proteica del músculo, en comparación con MC 1. A pesar de las enormes diferencias encontradas entre las propiedades de MC 1 y MC 2, la adición de liposomas al homogeneizado de músculo de merluza con sal permitió equiparar algunas propiedades del músculo en ambas formulaciones, como la capacidad de ligar agua a estructuras proteicas altamente organizadas, eliminando las diferencias iniciales atribuidas a la distinta funcionalidad proteica entre ambos músculos. Por tanto, estrategias alimentarias basadas en músculo de merluza adicionado con liposomas permiten la obtención de productos reestructurados de alto valor añadido de gran interés, incluso si la calidad funcional de la proteína muscular es deficiente.

El hecho de no observar diferencias apreciables en las propiedades físicas y estructurales de los homogeneizados de merluza en función del estado de hidratación de los liposomas cuando éstos llevan trealosa en su formulación pero sí cuando llevan glicerol implica que el tipo de protector también puede tener influencia en las propiedades del músculo, aparte del estado de hidratación de los liposomas. Sin embargo, dado que la calidad del músculo no fue la misma entre formulaciones M1 (liposomas con glicerol) y M2 (liposomas con trealosa), las diferencias encontradas entre ambos músculos no se pueden atribuir a un único factor, sino a la combinación de varios de ellos. En este último ensayo, aunque el tipo de tratamiento en los liposomas (congelación/descongelación y liofilización) y el tipo de protector añadido (glicerol y trealosa) pueden modificar en cierto modo las propiedades finales de los homogeneizados/geles resultantes, el factor clave que determina dichas propiedades fue la diferente calidad del músculo empleado en cada caso, ya que enmascara las posibles diferencias atribuibles a otros factores. Para una comparación más estricta en función de los parámetros relacionados con los liposomas, serían necesarios nuevos ensayos utilizando el mismo músculo de merluza para evitar que las diferencias se puedan atribuir a factores intrínsecos de la proteína.

9.5.3. Geles de pescado formulados con liposomas encapsulando bioactivos

A continuación, se elaboraron liposomas de fosfatidilcolina de soja incorporando diferentes extractos bioactivos: un hidrolizado peptídico procedente de piel y túnicas del manto del calamar gigante *Dosidicus gigas* (HC), un extracto polifenólico a partir de piel y albedo de la granada *Punica granatum* (PG), y un extracto lipídico rico en astaxantina obtenido a partir de residuos (cutículas, cefalotórax, etc.) del langostino *Litopenaeus vannamei* (GC). Paralelamente, se diseñó una formulación liposomal control sin bioactivo (L-V), denominado liposoma vacío. Los liposomas en estado liofilizado (responsables de aportar al músculo propiedades más adecuadas que las dispersiones según los ensayos anteriores) se incluyeron en surimi de calamar (*Dosidicus*

gigas), previamente homogeneizado con sal (NaCl, 1 %) y, posteriormente, las masas obtenidas se sometieron a un proceso de gelificación a 90 °C. De este modo, se obtuvieron los siguientes geles de surimi: G-L-V, G-L-HC, G-L-PG y G-L-GC. Un gel de surimi control sin liposomas (G) se estudió en paralelo. Además, se elaboró una formulación alternativa basada en la adición de los bioactivos directamente en el gel, sin liposomas, obteniendo los geles G-HC, G-PG y G-GC. Todos los geles obtenidos (8 en total) se sometieron a una digestión gastrointestinal *in vitro*.

El objetivo perseguido en este ensayo fue estudiar la interacción de los liposomas (esta vez rellenos con bioactivos de diferente naturaleza y composición) con otra matriz alimentaria de músculo de origen pesquero (surimi de calamar) y cómo influyen en sus propiedades estructurales y gelificantes. Además se quiso cuantificar la biodisponibilidad y bioaccesibilidad de los extractos bioactivos, mediante sus actividades potenciales antioxidante y antihipertensiva, cuando son incorporados (encapsulados en liposomas) en el surimi, tras someter los geles correspondientes a una digestión gastrointestinal *in vitro* (para comprobar si la presencia de liposomas mejora la digestibilidad proteica de los geles). Para demostrar la importancia de la cápsula en este tipo de formulaciones, se compararon las actividades potenciales de los geles con bioactivos encapsulados en liposomas y con bioactivos añadidos directamente.

Los liposomas conteniendo los extractos bioactivos (L-HC, L-PG y L-GC) se volvieron a elaborar y a caracterizar, con la finalidad de comprobar que tuvieran propiedades de partícula adecuadas para ser incorporados en el surimi. Estas propiedades no tienen por qué ser exactamente iguales a las obtenidas para los liposomas conteniendo los mismos extractos (Capítulo 2; diseño experimental 8.2.) ya que la cantidad total de suspensión liposomal preparada fue diferente a la utilizada en el ensayo anterior, diferencia suficiente como para que las características de unos y otros sean distintas. Sin embargo, cuando las condiciones de elaboración de liposomas sean exactamente las mismas en todos los parámetros, sus propiedades deberían ser prácticamente idénticas, siendo un proceso repetitivo.

Los tres liposomas liofilizados rellenos con HC, PG y GC presentaron un tamaño nanométrico (198,9-282,9 nm), una distribución de tamaños relativamente homogénea y un excelente potencial de membrana (entre -58,5 y -62,9 mV), además de una elevada tasa de encapsulación (63-95 %), por lo que fueron considerados liposomas adecuados para ser incorporados en la matriz de surimi.

Los geles conteniendo los extractos sin encapsular tuvieron un color más llamativo e intenso que sus respectivos geles incorporando los extractos en liposomas (Figura 83; capítulo 3). Además, las primeras formulaciones sufrieron importantes pérdidas de agua no experimentadas por el resto de geles. Estos geles están formulados como sistemas modelos, en los que solo contiene músculo y sal, por tanto su capacidad de retención de agua no es óptima. Una formulación para producto terminado tendría que considerar entre sus ingredientes algún ligante de agua para evitar la pérdida de ésta durante el procesado y posterior conservación del producto. En este sentido, la presencia de liposomas podría actuar como tal, ya que se ha observado que estas vesículas coloidales ayudan a mantener una estructura organizada y a aumentar la capacidad de retención de agua en estos geles y reestructurados de pescado (como ya se vio con los homogeneizados de merluza del apartado anterior). La ausencia de liposomas ocasiona la interacción directa entre extracto y músculo, lo que causa una fuerte interferencia en la formación de la red proteica, debido probablemente a una alteración en el estado de hidratación de la proteína miofibrilar. Por tanto, concluimos que la presencia de liposomas es de gran interés para obtener geles mejor organizados estructuralmente, sin pérdidas de agua, a la vez que permite enmascarar el color cuando sea éste el interés, y por supuesto proteger mediante el recubrimiento al compuesto activo de posibles interacciones con la matriz que le hagan menos activo y disponible o bien más sensible al procesado. Por el contrario, los geles sin liposomas

requieren de completar la formulación con ingredientes ligantes para retener el agua, si bien en este caso los compuestos bioactivos no se verán protegidos de las posibles interacciones con el resto de la matriz durante el procesado.

Centrados ya únicamente en los geles conteniendo extractos bioactivos encapsulados en liposomas (G-L-HC, G-L-PG y G-L-GC), con los dos controles correspondientes (G y G-L-V), las propiedades estudiadas mostraron que todos los geles tuvieron una baja solubilidad proteica, como cabía esperar a su estado de red o matriz agregada. La adición de liposomas aumenta esta solubilidad, probablemente porque interfieren con la matriz muscular y alteran su organización estructural, dando lugar a geles menos agregados y ligeramente más débiles. El estudio de las propiedades mecánicas de los geles aportó las mismas conclusiones, donde los geles conteniendo liposomas (tanto vacíos como con extractos) mostraron una menor fuerza de gel y como consecuencia la obtención de geles más débiles respecto al gel control (G). Esta conclusión concuerda con la obtenida en el capítulo 3 con los homogeneizados de músculo de merluza. Por tanto, podemos concluir que los liposomas interfieren en las interacciones proteína-proteína de la matriz muscular y modifican sus propiedades estructurales. En general, es conocido que las proteínas de pescado tienen una fácil digestibilidad, no obstante, durante el proceso de gelificación, debido al aumento de enlaces entrecruzados y covalentes, disminuye, como se puede apreciar de manera indirecta a la vista de la gran disminución de su solubilidad proteica como una primera aproximación, sin que ocurra un tratamiento enzimático de digestibilidad *in vitro* por medio. No obstante, es evidente que la presencia de liposomas en el reestructurado facilita el grado de solubilización de la matriz del gel, por lo que cabe esperar que presumiblemente sea más digerible.

Dado que los geles portan liposomas, estructuras que por su composición rica en ácidos grasos poliinsaturados son susceptibles de sufrir oxidación lipídica, dichos geles también serían susceptibles de sufrir la oxidación de los lípidos. La cuantificación del producto de oxidación secundaria malonaldehído, por la técnica de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, reflejó que los extractos bioactivos estuvieron eficientemente encapsulados en los liposomas y no disponibles para evitar totalmente la oxidación de los geles, que experimentaron un ligero aumento de la rancidez probablemente debido al proceso de formación de liposomas y/o posterior proceso de gelificación de las matrices de surimi. Hay que tener en cuenta que los valores de oxidación fueron muy bajos en todos los casos y que la adición de liposomas liofilizados en el músculo de surimi ayudó a mantener la estabilidad de los geles resultantes durante largos periodos de tiempo (hasta 7 meses) conservados en congelación a -20 °C.

Finalmente, se cuantificó la actividad antioxidante y antihipertensiva de los geles con bioactivos libres y encapsulados en liposomas, así como del gel control, sometidos a digestión gastrointestinal *in vitro* con el objetivo de estudiar la biodisponibilidad de los extractos y la importancia de la cápsula en la protección de bioactivos cuando éstos son incorporados en matrices alimentarias. Los resultados demostraron el efecto protector de los liposomas sobre los extractos bioactivos y, aunque no fueron concluyentes para la actividad antihipertensiva, confirmaron, a través de la actividad antioxidante, que la formulación de geles de surimi garantiza que el poder antioxidante de los bioactivos (mucho más destacado para las formulaciones con PG) pueda ser aprovechado una vez llegue al interior del organismo, demostrando la importancia de la matriz muscular en la mejora de la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los extractos bioactivos cuando éstos son incorporados encapsulados en liposomas.

El hecho de que no sea concluyente para la capacidad antihipertensiva se debe a que, tras la digestión gastrointestinal simulada, no se puede diferenciar si el origen de la actividad proviene de la matriz o del bioactivo encapsulado inicialmente. Pero sí se puso de manifiesto que la digestión del gel fue efectiva y por tanto la agregación de la matriz, producida tanto con

liposomas como sin ellos, continúa ofreciendo las propiedades de fácil digestibilidad que caracteriza al músculo de pescado. Podríamos concluir que la incorporación de liposomas rellenos de bioactivos en surimi de calamar da lugar a geles con una fuerza de cohesión diferente a la del control y favorece la conservación a largo plazo de los mismos (susceptibles de una mínima oxidación), donde el bioactivo está eficientemente encapsulado en liposomas incluso después de ser incorporados éstos en la matriz de surimi de calamar, siendo protegido y quedando su bioactividad disponible para ser posteriormente aprovechada. Por tanto, la adición de liposomas liofilizados conteniendo extractos bioactivos en músculo de surimi es una estrategia adecuada para la obtención de geles de pescado funcionales con un alto valor añadido, gracias a la incorporación de los liposomas.

9.6. Aplicación de liposomas en películas comestibles

Otra de las aplicaciones que ofrecen los liposomas es la de ser incorporados en biopolímeros naturales para la obtención de películas comestibles activas. Los biopolímeros pueden ser polisacáridos, proteínas o lípidos, siempre que tengan la capacidad de formar películas, es decir, que puedan aportar propiedades texturizantes, estabilizantes y/o espesantes. La matriz es capaz de proteger a los liposomas y al bioactivo encapsulado, mientras que las vesículas pueden modificar las propiedades físico-estructurales de la película, además de aportar propiedades funcionales, permitiendo la obtención de un producto de alto valor añadido. Estas películas pueden ser ingeridas por sí solas, como alimento o preparado de alto valor nutricional o bioactivo, o bien funcionar a modo de recubrimiento de otros alimentos de baja humedad. En función de las propiedades finales de la película, ésta podrá tener diversas aplicaciones como envoltura de otros alimentos, como pueden ser frutos secos o barritas de cereales, como matriz tipo pasta (ravioli y otros), como masa envolvente (tipo “wrap”) utilizada para fajitas, burritos y similares, etc. Estas películas son capaces de aislar el producto que recubren, actuando de barrera frente a diversos compuestos como el oxígeno, dióxido de carbono, agentes patógenos, partículas externas indeseables, etc., incrementando así la vida útil del producto. Además, el hecho de que sean comestibles les hace ser también biodegradables, lo que permite la sustitución de las películas sintéticas, reduciendo el coste económico y los problemas medioambientales que conlleva el uso de plásticos. Actualmente se emplean también en otros ámbitos como en el de la medicina, donde soluciones de polímeros, como carboximetilcelulosa, forman geles y son utilizados en diversos tipos de cirugías.

Los liposomas contenidos en las películas comestibles, cuando son consumidos, no solo están destinados a ser absorbidos en el intestino tras pasar por el tracto digestivo (digestión), sino que también pueden ser absorbidos previamente a nivel bucal, a través del tracto sublingual. Para ello, las propiedades finales de las películas deberán ser las adecuadas en cada caso. Para que los liposomas sean correcta y eficientemente absorbidos a nivel bucal y sublingual, las películas, además de ingerirse aisladamente, deberían ser solubles en boca (disolución rápida) y relativamente adherentes. Sin embargo, si las películas están destinadas a funcionar como recubrimiento de otro alimento (ya sea por sus propiedades tecno-funcionales o activas), los liposomas presentes en ellas serán mayormente absorbidos a nivel intestinal, en cuyo caso no primarían las propiedades de solubilidad y mucoadherencia en las películas, y sí otras como el grosor, el grado de transparencia o la flexibilidad, si bien la mucoadherencia podría jugar un papel posterior relevante a nivel intestinal, pero hoy por hoy es mera especulación.

Con tal propósito, se llevaron a cabo dos estudios de liposomas en películas comestibles: unas películas a base de caseinato sódico incorporando los liposomas que encapsulaban una fracción peptídica <1 kDa procedente de langostino (P-L-FP1-G), con su correspondiente control (P_{CAS}+G), y otras películas a base de carboximetilcelulosa sódica incorporando los liposomas que contenían un hidrolizado de colágeno procedente de tónicas de calamar (P-L-HC-G), con su respectivo control (P_{CMC}+G). Todas las películas elaboradas incluían glicerol en la formulación,

dado que este compuesto no sólo preserva y mantiene la estabilidad de los liposomas, sino que también aporta flexibilidad y plasticidad a la película, evitando su posible rotura o resquebrajamiento. El glicerol puede ser incorporado, como vimos en el capítulo 4 (diseño experimental 8.9.), tanto directamente sobre la disolución del biopolímero como previamente durante la fabricación de los liposomas. Las películas de caseinato sódico (P-L-FP1-G), dadas las características propias del biopolímero, estarán destinadas a funcionar como un producto alimenticio en sí mismo (siendo ingeridas por sí solas) donde los liposomas incorporados sean absorbidos a nivel bucal y sublingual. En cambio, las películas de carboximetilcelulosa (P-L-HC-G) tendrán como aplicación la de envolver a otros alimentos de baja humedad, funcionando como un recubrimiento comestible donde los liposomas sean principalmente absorbidos intestinalmente tras el proceso de digestión.

Los péptidos bioactivos (FP1 y HC) son los encargados de aportar, principalmente, el valor funcional a la matriz, adicional al propio del biopolímero y de los fosfolípidos que forman los liposomas. Sin embargo, estos péptidos no influyeron significativamente en las propiedades físicas de las películas. La presencia de liposomas en dichas películas fue confirmada mediante microscopía electrónica de transmisión a temperatura criogénica constatando su morfología esférica. En términos generales, la adición de liposomas en ambas películas indujo una disminución de su contenido en agua, debido a la mayor presencia de material seco (fosfatidilcolina) en la fórmula y un incremento muy notable de su capacidad adherente y mucoadhesiva, facilitando así su unión a otras superficies, como las mucosas. El resto de propiedades físicas de las películas (solubilidad en agua, espesor o transparencia) variaron en función del tipo de biopolímero empleado en la formulación. De hecho, el tipo de polímero utilizado como matriz es uno de los factores más determinantes en las propiedades finales de las películas. Otro factor definitivo o concluyente es el producto sobre el que se aplique la película, o más bien las interacciones resultantes de dicha aplicación. Por ejemplo, Cui et al. (2017a) observaron una evidente actividad frente a *E. coli* en tomates cherry por parte de liposomas encapsulando fagos y embebidos en una película de quitosano, demostrando que los liposomas liberaban gradualmente el fago. Sin embargo, Haghju et al. (2016) observaron que liposomas de lecitina de soja incorporados en una película de quitosano reducían la capacidad antimicrobiana del extracto de ortiga encapsulado. En este último estudio la película no fue aplicada sobre ningún alimento y, como vemos, tuvo un efecto totalmente opuesto al obtenido en el estudio de Cui et al. (2017a).

Por esta razón, las diferencias que se verán a continuación entre las películas de caseinato y las de carboximetilcelulosa se deben principalmente al diferente tipo de biopolímero utilizado y a las características intrínsecas y propias de cada uno de ellos, ya que ambas incorporan el mismo tipo de liposomas (de fosfatidilcolina parcialmente purificada a partir de lecitina de soja) con glicerol, encapsulando en ambos casos péptidos bioactivos de relativa similitud (FP1 y HC), no habiendo sido ninguna de ellas aplicada como recubrimiento de ningún producto o alimento.

Las películas de caseinato sódico presentaron un ligero mayor contenido en humedad que las películas de carboximetilcelulosa sódica (CMC) (Tabla 57), aunque sin diferencias significativas. Del mismo modo, las de caseinato mostraron una reseñable capacidad adherente, muy por encima ($p \leq 0,05$) de la encontrada para las de carboximetilcelulosa. En cambio, las películas de carboximetilcelulosa tuvieron un mayor grado de opacidad ($p \leq 0,05$), lo que coincide con su también mayor espesor ($p \leq 0,05$). Este mayor espesor en las películas de CMC fue diseñado con la finalidad de poder incorporar una mayor cantidad de liposomas en su interior. A pesar de disolver la CMC a una concentración menor (4 %) que el caseinato (8 %), se consiguió el esperado mayor espesor en las películas de carboximetilcelulosa, atribuyéndose esta propiedad a las características intrínsecas del biopolímero. Estos resultados se repiten cuando los liposomas son incorporados en las correspondientes matrices poliméricas (Tabla 57), aunque sin diferencias significativas en el caso de la opacidad. Hay que destacar que tras la adición de liposomas el

espesor no varía en las películas de caseinato, pero sí aumenta en las de carboximetilcelulosa. Estos resultados se deben a la mayor concentración de liposomas en la formulación de CMC (1:1, v/v) frente a la de caseinato (1:0,6, v/v).

Tabla 57. Propiedades físicas y mecánicas de las películas de caseinato y carboximetilcelulosa (CMC) incorporando liposomas cargados con péptidos bioactivos. Diferentes letras (x, y) indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre películas vacías y entre películas incorporando liposomas, con distinto biopolímero.

| | Humedad (%) | Solubilidad (%) | Espesor (μm) | Opacidad | Adherencia (N) |
|-----------------|------------------|------------------|---------------------------|-----------------|--------------------|
| Caseinato | $37,6 \pm 1,4^x$ | $37,6 \pm 1,4^x$ | 100 ± 20^x | $1,1 \pm 0,4^x$ | $1180 \pm 0,0^x$ |
| CMC | $31,8 \pm 3,9^x$ | $66,1 \pm 9,5^y$ | 207 ± 50^y | $3,6 \pm 0,3^y$ | $37,8 \pm 6,7^y$ |
| Caseinato-L-FP1 | $28,5 \pm 1,3^x$ | $58,4 \pm 2,4^x$ | 100 ± 30^x | $1,2 \pm 0,0^x$ | 3550 ± 300^x |
| CMC-L-HC | $21,7 \pm 2,9^x$ | $37,6 \pm 5,1^y$ | 328 ± 39^y | $1,3 \pm 0,5^x$ | $392,1 \pm 25,1^y$ |

Por otro lado, la solubilidad en agua fue superior en las películas de carboximetilcelulosa ($p \leq 0,05$), aunque tras la adición de los liposomas ésta fue mayor para las películas de caseinato ($p \leq 0,05$). Este resultado indica que la solubilidad puede estar relacionada con el espesor, ya que, aunque las matrices de carboximetilcelulosa son las más gruesas y con mayor solubilidad, la inclusión de una mayor cantidad de liposomas en el polímero origina una película considerablemente más gruesa y menos soluble.

A rasgos generales, dados los resultados obtenidos, podríamos concluir que las películas de caseinato con y sin liposomas tienen mayor contenido en agua y, como consecuencia, son más adherentes. Estas características les hacen ser películas finas y muy adhesivas. Las películas de carboximetilcelulosa incorporando liposomas, mientras tanto, son películas relativamente gruesas, menos opacas, más fuertes y flexibles, con menor capacidad adherente. Estas diferencias son claramente visibles en la figura 126.

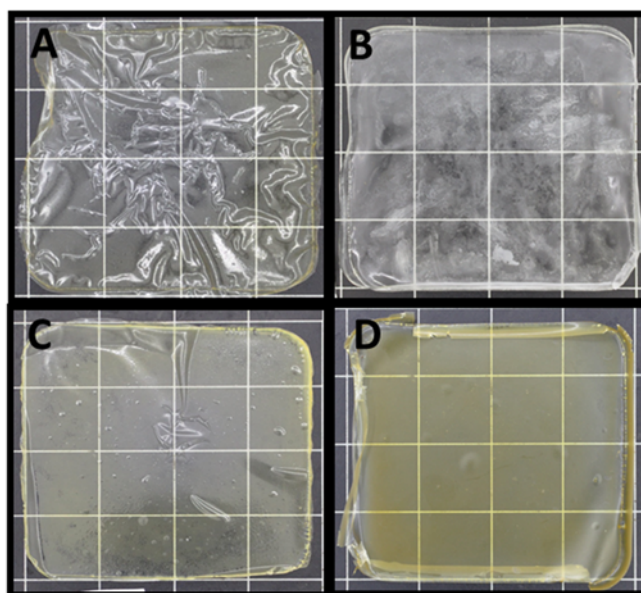


Figura 126. Imágenes de las películas. A) Película de caseinato. B) Película de carboximetilcelulosa. C) Película de caseinato con liposomas. D) Película de carboximetilcelulosa con liposomas.

Los liposomas en el caseinato se quedan como inclusiones que disgregan o interrumpen la matriz y le confieren sus propiedades características, probablemente por las cualidades de la caseína.

La caseína es un conjunto de subunidades de peso molecular comprendido entre 20,000 y 25,000 Da. Los liposomas en la CMC parece que quedan enmarañados en su interior, probablemente porque la CMC tiene un peso molecular mínimo de 90,000 Da (casi 4 veces superior al de la caseína), envolviéndolos y aportándole las características de mayor espesor y flexibilidad. Estas diferencias, aportadas por el tipo de biopolímero empleado, ofrecen diferentes posibilidades de aplicación. Así, las películas elaboradas con caseinato podrían emplearse como alimentos por sí mismos, ya que serían películas que se adherirían correctamente a la lengua dada su elevada capacidad de adhesión y se disgregarían fácilmente en boca dado su bajo grosor y su buena solubilidad, permitiendo una eficiente absorción a través del tracto sublingual. Un análisis sensorial confirmó estos resultados y la buena aceptabilidad del producto para ser consumido como tal (Capítulo 4, diseño experimental 8.8.). Por otro lado, las películas de carboximetilcelulosa podrían utilizarse como material envolvente comestible de alimentos de baja humedad, dado su mayor grosor y flexibilidad. Además, el elevado grado de transparencia obtenido en las películas de carboximetilcelulosa con liposomas es el adecuado para este tipo de productos, ya que permite la correcta visualización del material o alimento envuelto por la película, factor muy tenido en cuenta por los consumidores. El hecho de que disminuya su solubilidad (cuando incorporan liposomas) podría facilitar su función de barrera frente a compuestos externos (gases, humedad, etc.) y limitar la interacción con el producto que envuelvan, evitando así posibles modificaciones en el mismo y aumentando la aplicabilidad a alimentos con mayor grado de humedad. En este caso, los liposomas pasarían preferentemente al tracto digestivo, siendo sometidos a digestión (han demostrado ser resistentes al proceso de digestión, como se vio en el diseño experimental 8.9. del capítulo 4) y posteriormente absorbidos en el intestino.

Actualmente existen varios productos comercializados basados en películas comestibles, tanto para absorción oral como para ser digeridos. Entre los más conocidos destacan películas conteniendo cafeína (Patel et al., 2011) o películas de insulina (Modi et al., 2002), ambas para administración oral y absorción a nivel bucal y sublingual. Sin embargo, cada día es más frecuente la aplicación de aerosoles para la formación de películas instantáneas con liposomas o fármacos, a nivel farmacológico, para aplicación nasal y de otras zonas mucosas del cuerpo, para que el bioactivo pase directamente a través de las mucosas. Esto sugiere la viabilidad de las películas y la versatilidad de su aplicación, lo cual le augura un futuro prometedor. Aunque se trata de un área que está recibiendo gran interés en la comunidad científica, aún no existen en el mercado productos basados en películas comestibles incorporando bioactivos previamente encapsulados en liposomas, a pesar de las enormes ventajas y posibilidades que ofrece la adición de liposomas en dichas películas, por lo que la comercialización de películas comestibles como las desarrolladas en esta Memoria sería de gran interés.

9.7. Evaluación de las posibles Declaraciones nutricionales de las formulaciones con liposomas

Los alimentos basados en liposomas poseen propiedades beneficiosas para la salud atribuidas tanto a la propia matriz como al liposoma en sí y al bioactivo encapsulado, tal y como se ha demostrado en los diversos capítulos. Dado que los liposomas son el ingrediente base de las matrices alimentarias estudiadas en esta Memoria, se abordarán las propiedades saludables derivadas de los mismos. Como ya se mencionó al comienzo de esta discusión integradora, los liposomas, debido a que están elaborados a partir de fosfatidilcolina parcialmente purificada con una composición rica en ácidos grasos poliinsaturados, aportarían enormes beneficios sobre la salud. Puesto que esta es una afirmación muy genérica, se ha llevado a cabo un detallado estudio de composición en sustancias beneficiosas que pueden aportar los liposomas, tanto aislados como embebidos en las matrices alimentarias, en función de cada uno de sus compuestos lipídicos principales. A este respecto, podríamos resumir que, dada la composición lipídica de la fosfatidilcolina purificada cinco veces (FC5) vista en el capítulo 1, los liposomas son

ricos en ácidos grasos insaturados, destacando entre ellos el ácido linoleico (C18:2n6c), el ácido linolénico (C18:3n3) y el ácido oleico (C18:1n9c).

Según el Reglamento de la Comisión (Nº 116, 2010) por el que se modifica el Reglamento (CE) 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a la lista de declaraciones nutricionales y el Reglamento de la Comisión Europea (Nº 432, 2012) por el que se establece la lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños, los alimentos sujetos a estudio nutricional deben aportar cantidades mínimas necesarias de determinados compuestos para que se le atribuyan las propiedades saludables correspondientes a dichos compuestos. De este modo, la mayoría de formulaciones basadas en liposomas que se han elaborado en esta Memoria pueden considerarse productos que *“contribuyen a mantener niveles normales de colesterol sanguíneo”* en base a un alto contenido en grasas insaturadas ya que, de acuerdo a los reglamentos mencionados, *“al menos un 70 % de los ácidos grasos presentes en el producto proceden de grasas insaturadas y las grasas insaturadas aportan más del 20 % de valor energético del producto”* (Tabla 58).

Más específicamente, las formulaciones pueden considerarse también productos con un alto contenido en grasas poliinsaturadas, puesto que *“al menos un 45 % de los ácidos grasos presentes en el producto proceden de grasas poliinsaturadas y las grasas poliinsaturadas aportan más del 20 % del valor energético del producto”* (Tabla 58). Además, esta declaración establece que los productos sean ricos en ácido oleico.

Tabla 58. Grasas insaturadas y poliinsaturadas de las formulaciones con liposomas.

| Producto | Muestra | Grasas insaturadas | | Grasas poliinsaturadas | |
|--------------------------|-----------------------|--------------------|----------------------|------------------------|----------------------|
| | | Proporción (%) | Valor energético (%) | Proporción (%) | Valor energético (%) |
| Dispersiones liposomales | L-V | 74,4* | 59,4* | 66,0* | 52,7* |
| | L-GC | 74,4* | 59,9* | 66,0* | 53,1* |
| | Liposomas L-V | 74,4* | 59,4* | 66,0* | 52,7* |
| | lioofilizados L-GC | 74,4* | 59,9* | 66,0* | 53,1* |
| Películas caseinato | P-L-V | 74,4* | 30,5* | 66,0* | 27,0* |
| | P-L-FP1 | 74,4* | 30,0* | 66,0* | 26,6* |
| Películas CMC | P-L-HC-G | 74,4* | 51,4* | 66,0* | 45,6* |
| Reestructurados merluza | F, AP, CD, CD-G, CD-T | 74,4* | 19,9 | 66,0* | 17,6 |
| | LF | 74,4* | 24,1* | 66,0* | 21,3* |
| | LF-G | 74,4* | 17,7 | 66,0* | 15,7 |
| | A | 74,4* | 26,7* | 66,0* | 23,7* |
| | LF-T | 74,4* | 20,4* | 66,0* | 18,1 |
| Geles surimi | G-L-V | 74,4* | 22,7* | 66,0* | 20,1* |
| | G-L-HC | 74,4* | 22,2* | 66,0* | 19,7 |
| | G-L-PG | 74,4* | 22,1* | 66,0* | 19,6 |
| | G-L-GC | 74,4* | 23,0* | 66,0* | 20,4* |

*Formulaciones liposomales que cumplen los requisitos establecidos por los reglamentos europeos para cada parámetro.

Los Reglamentos anteriores establecen una cantidad mínima de “1,5 g de ácido linoleico por 100 g y 100 Kcal”, así como una cantidad mínima de “0,3 g de ácido alfa-linolénico por 100 g y 100 Kcal”, para que dichos productos sean considerados ricos en ácido linoleico y/o ácido linolénico, respectivamente. Las tablas 59 y 60 reflejan las cantidades de ambos ácidos grasos poliinsaturados aportadas por cada producto, por cada 100 g de producto (Tabla 59) y por cada 100 Kcal (Tabla 60).

Tabla 59. Contenido en ácido linoleico, ácido linolénico y sumatorio de ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), y sus calorías aportadas, por cada 100 g de producto con liposomas.

| Producto | Muestra | por 100 g producto | | | Kcal |
|--------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-------------------|--------|
| | | Ác. linoleico (g) | Ác. linolénico (g) | EPA + DHA (mg) | |
| Dispersiones liposomales | L-V | 2,93* | 0,38* | - | 56,34 |
| | L-GC | 2,94* | 0,38* | 33,12 | 58,14 |
| Liposomas liofilizados | L-V | 27,14* | 3,48* | - | 522,9 |
| | L-GC | 27,47* | 3,50* | 276,55* | 486,03 |
| Películas caseinato | P-L-V | 10,30* | 1,32* | - | 386,3 |
| | P-L-FP1 | 9,24* | 1,19* | - | 352,97 |
| Películas CMC | P-L-HC-G | 17,67* | 2,27* | - | 393,2 |
| Reestructurados merluza | F, AP, CD, CD-G, CD-T | 0,97 | 0,12 | - | 56,06 |
| | LF | 1,15 | 0,15 | - | 55,12 |
| | LF-G | 0,82 | 0,11 | - | 53,05 |
| | A | 1,36 | 0,17 | - | 58,18 |
| | LF-T | 1,02 | 0,13 | - | 57,16 |
| Geles surimi | G-L-V | 2,24* | 0,29 | - | 112,94 |
| | G-L-HC | 2,18* | 0,28 | - | 112,4 |
| | G-L-PG | 2,18* | 0,28 | - | 112,8 |
| | G-L-GC | 2,27* | 0,29 | 24,84 | 113,18 |

*Formulaciones liposomales que cumplen los requisitos establecidos por los reglamentos europeos para cada parámetro.

Respecto al ácido linoleico, todas las formulaciones ensayadas aportan la cantidad mínima necesaria (>1,5 g/100 g producto y 100 Kcal), excepto los reestructurados de merluza. A pesar de no aplicarse esta declaración para los reestructurados, estos productos aportan cantidades considerables de ácido linoleico, quedando bastante cerca de los límites necesarios. En cuanto al ácido linolénico, la declaración es cumplida por todas las formulaciones (>0,3 g/100 g de producto y 100 Kcal) exceptuando reestructurados de merluza y geles de surimi. De igual modo que en el anterior, ambos tipos de productos aportan cantidades de ácido linolénico a tener en cuenta, sobre todo los geles de surimi que quedan por debajo del límite necesario por apenas 0,02 g.

Por otro lado, los reglamentos establecen una declaración de fuente de ácidos grasos omega-3 para aquellos productos que aporten “al menos 40 mg de la suma de ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico por 100 g y 100 Kcal”. Para esta declaración solo se tendrán en cuenta

aquellos productos que contengan el bioactivo de grasa de crustáceo (GC), es decir, la dispersión liposomal y el liposoma liofilizado conteniendo el bioactivo (L-GC) y el gel de surimi que incorpora el liposoma con la grasa de crustáceo encapsulada (G-L-GC). Únicamente la formulación del liposoma liofilizado cumplió los requisitos, facilitado por su menor contenido en agua. La dispersión liposomal también aportó cantidades considerables del sumatorio de ambos ácidos.

Tabla 60. Contenido en ácido linoleico, ácido linolénico y sumatorio de ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) por cada 100 Kcal de producto con liposomas.

| Producto | Muestra | por 100 Kcal de producto | | |
|--------------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|-------------------|
| | | Ác. linoleico (g) | Ác. linolénico (g) | EPA + DHA (mg) |
| Dispersiones liposomales | L-V | 5,20* | 0,67* | - |
| | L-GC | 5,06* | 0,65* | 56,97* |
| Liposomas liofilizados | L-V | 5,19* | 0,67* | - |
| | L-GC | 5,65* | 0,72* | 56,90* |
| Películas caseinato | P-L-V | 2,67* | 0,34* | - |
| | P-L-FP1 | 2,62* | 0,34* | - |
| Películas CMC | P-L-HC-G | 4,49* | 0,58* | - |
| Reestructurados merluza | F, AP, CD, CD-G, CD-T | 1,73* | 0,21 | - |
| | LF | 2,09* | 0,27* | - |
| | LF-G | 1,55* | 0,21* | - |
| | A | 2,34* | 0,29* | - |
| | LF-T | 1,78* | 0,23* | - |
| Geles surimi | G-L-V | 1,98* | 0,26 | - |
| | G-L-HC | 1,94* | 0,25 | - |
| | G-L-PG | 1,93* | 0,25 | - |
| | G-L-GC | 2,01* | 0,26 | 21,95 |

*Formulaciones liposomales que cumplen los requisitos establecidos por los reglamentos europeos para cada parámetro.

Por tanto, alguno de los productos elaborados con liposomas puede considerarse fuente de ácidos grasos omega 3 (L-GC liofilizado) y la mayoría de las formulaciones con un alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados, destacando como principales el ácido linoleico y el ácido linolénico. Entre formulaciones, las dispersiones liposomales, los liposomas liofilizados y las películas comestibles son los productos que más alegaciones de salud presentan en términos de propiedades aportadas por los liposomas (fosfatidilcolina), en comparación con los reestructurados de merluza y los geles de surimi, debido al efecto de dilución provocado al incorporar los liposomas en las matrices musculares.

La tabla 61 muestra las cantidades diarias de ingesta necesarias de cada producto para conseguir el efecto beneficioso de los diferentes compuestos. Dado que los productos más saludables (dispersiones, liofilizados y películas) son aquellos con mayores cantidades de los diversos ácidos grasos poliinsaturados, hace falta ingerir menos cantidad de dichos productos para obtener el

beneficio asociado a sus componentes. Por tanto, estas tres formulaciones son las más rentables para conseguir las propiedades saludables que aportan los ácidos grasos sin tener que consumir cantidades diarias excesivas de producto, como podría ser el caso de los reestructurados de merluza y los geles de surimi. Sin embargo, el consumo moderado de cualquiera de estos dos últimos productos aportaría cantidades considerables de ácidos grasos poliinsaturados o bien se puede combinar la ingesta moderada de ellos junto con otros productos ricos en ácidos grasos poliinsaturados para obtener las propiedades beneficiosas diarias.

Tabla 61. Cantidad necesaria que habría que ingerir diariamente de cada producto con liposomas para obtener los beneficios asociados a cada uno de los ácidos mostrados en la tabla.

| Producto | Muestra | Ác. linoleico (10g) | Ác. linolénico (2g) | EPA + DHA (250mg) |
|--------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|----------------------|
| Dispersiones liposomales | L-V | 341,3 | 533,3 | - |
| | L-GC | 340,1 | 529,1 | 754,8 |
| Liposomas liofilizados | L-V | 36,8 | 57,5 | - |
| | L-GC | 36,4 | 57,1 | 90,4 |
| Películas caseinato | P-L-V | 97,1 | 151,5 | - |
| | P-L-FP1 | 108,2 | 168,1 | - |
| | P-L-HC-G | 56,6 | 88,1 | - |
| Reestructurados merluza | F, AP, CD, CD-G, CD-T | 1030,9 | 1666,7 | - |
| | LF | 869,6 | 1333,3 | - |
| | LF-G | 1219,5 | 1818,2 | - |
| | A | 736,3 | 1176,5 | - |
| | LF-T | 980,4 | 1538,5 | - |
| Geles surimi | G-L-V | 446,4 | 689,7 | - |
| | G-L-HC | 458,7 | 714,3 | - |
| | G-L-PG | 458,7 | 714,3 | - |
| | G-L-GC | 440,5 | 689,7 | 1006,4 |

También hay que considerar que las dispersiones liposomales para el estudio de la presente Memoria se han realizado en una solución estándar y única, pero podría plantearse realizar alguna más concentrada, si bien habría que estudiar estabilidad de las partículas en este caso. Así, dispersiones liposomales más concentradas podrían ser adicionadas en matrices alimentarias tipo miosistemas u otras, cumpliendo con los reglamentos para obtener un beneficio asociado.

10. CONCLUSIONES

Purificación y procesado

1. La purificación de fosfolípidos de la lecitina de soja disminuyó progresivamente el contenido en lípidos neutros, ácidos grasos libres y tocoferol, y condujo a un enriquecimiento del compuesto mayoritario, la fosfatidilcolina. Los ácidos grasos predominantes fueron poliinsaturados, siendo el más abundante el ácido linoleico (C18:2n6c).
2. Los nanoliposomas producidos a partir de fosfolípidos más purificados, con sonicación fuerte y prolongada y con presencia de glicerol (L5A) presentaron menor diámetro de partícula, y mayor estabilidad térmica y en el tiempo que el resto de liposomas estudiados. Los liposomas producidos con fosfolípidos menos purificados no perdieron el rango nanométrico y presentaron mayor contenido en tocoferol.

Tratamientos de estabilización

3. La congelación/descongelación, atomización o liofilización de los liposomas incrementaron notablemente el tamaño de partícula y alteraron su estructura. La adición de protectores, como el glicerol o la trealosa, contribuyeron parcialmente a evitar dichos efectos. El glicerol se mostró muy efectivo como crioprotector, mientras que ambos, glicerol y trealosa, mostraron un efecto lioprotector moderado. Por el contrario, un tratamiento de alta presión (600 MPa/20 °C/20 min) no alteró las propiedades de partícula.

Encapsulación de bioactivos

4. Todos los liposomas de fosfatidilcolina (L5A) rellenos de extractos bioactivos presentaron un tamaño nanométrico (90-150 nm) con distribución de tamaños relativamente homogénea, elevada estabilidad de partícula (potencial zeta entre -28 y -54 mV) y alta tasa de encapsulación del bioactivo, variando entre un 52 % y un 83 %, en función del extracto. Además mostraron una alta estabilidad durante al menos 3 semanas de conservación en refrigeración.
5. El proceso de liofilización aumentó la eficacia de encapsulación y causó cambios estructurales en la membrana lipídica en función de la naturaleza química del compuesto encapsulado, siendo los liposomas rellenos del extracto de grasa los de mayor estabilidad y los del extracto polifenólico de piel-albedo de granada los menos estables. Sin embargo, la incorporación de cualquiera de los extractos mantuvo la estabilidad en el tiempo de los liposomas liofilizados durante su conservación y protegió de la oxidación lipídica.
6. Los liposomas mantuvieron o incrementaron las actividades biológicas (antioxidante, antihipertensiva e hipoglucemiante) propias de cada uno de los extractos ensayados. Además, la encapsulación en nanoliposomas permitió la determinación de la actividad antioxidante de la grasa de crustáceo en un sistema hidrofílico.
7. Los liposomas resistieron la digestión gastrointestinal *in vitro*, tras la cual aumentó la bioaccesibilidad del ácido clorogénico en liposomas con extracto acuoso de hinojo, y también la del hidrolizado de colágeno encapsulado, evaluada esta última en términos de actividad antihipertensiva.
8. La absorción intestinal *in vitro* del ácido clorogénico presente en el extracto acuoso de hinojo, determinada a través de un modelo celular de epitelio intestinal humano con células Caco-2, fue del 1,5 %, siendo similar a la de la fracción libre de la dispersión liposomal.

Aplicación en matrices alimentarias

En sistemas musculares

9. La adición de liposomas en miosistemas de merluza y de calamar interfirió en las interacciones proteína-proteína de la matriz y aumentó la capacidad de retención de agua. Los liposomas dieron lugar a geles más blandos y menos deformables, pero más estables durante el almacenamiento en congelación.
10. Los liposomas, con independencia del tipo de extracto encapsulado, favorecieron la digestibilidad del gel y aumentaron su actividad antioxidante.
11. La encapsulación de los extractos, además, se mostró como una estrategia tecnológica para mitigar coloraciones demasiado intensas y evitar el exudado de agua en los reestructurados.

En películas comestibles

12. Los liposomas resistieron el proceso de secado de las películas y su incorporación aumentó la adhesividad de las mismas, sin embargo otras propiedades dependieron del tipo de biopolímero. Así, en matrices de caseinato sódico los liposomas dieron lugar a películas muy mucoadhesivas y solubles, características que facilitan su rápida disolución en boca, lo cual podría favorecer su absorción a nivel oral y sublingual. Además, la adición de liposomas no afectó al sabor y mejoró la palatabilidad de las películas. Por otro lado, en matrices de carboximetilcelulosa los liposomas redujeron la solubilidad y aumentaron la resistencia de las películas, lo que permitiría su utilización como recubrimiento.
13. Los liposomas resistieron la digestión gastrointestinal *in vitro* de las películas de carboximetilcelulosa, en mayor medida cuando el glicerol se incorporó como parte del liposoma, en vez de añadido como plastificante en la película, ya que contribuyó a estabilizar el tamaño y la morfología de los liposomas.

Conclusión general

Los liposomas, encapsulando o no compuestos bioactivos, pueden ser utilizados como ingredientes tecno-funcionales estables y de gran versatilidad para el desarrollo de alimentos funcionales.

11. BIBLIOGRAFÍA

- A.O.A.C. (2005). Official methods of analysis. Gaithersburg, MD, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- Aasen, I.M., Markussen, S., Møretrø, T., Katla, T., Axelsson, L. and Naterstad, K., (2003). Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *International Journal of Food Microbiology*, 87 (1-2), 35-43.
- Actis-Goretta, L., Ottaviani, J.I., Keen, C.L. and Fraga, C.G. (2003). Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by flavan-3-ols and procyanidins. *FEBS Lett*, 555 (3), 597-600.
- Adler-Nissen, J. (1986). A review of food hydrolysis-specific areas. En: J. Adler-Nissen. (Ed.), *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins* (pp. 57-109). Copenhagen, Denmark: Elsevier Applied Science Publishers.
- AETSA Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía. (2010). Eficacia de la insulina de administración oral/bucal en el tratamiento de la diabetes mellitus. Recuperado de: http://www.aetsa.org/download/publicaciones/antiguas/AETSA_2007-02-16_InsulinaOral.pdf.
- Aho, J., Boetker, J.P., Baldusdottir, S. and Rantanen, J. (2015). Rheology as a tool for evaluation of melt processability of innovative dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*, 494, 623-642.
- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M. and Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: Classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, 8 (1), 1–8.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2003). Molecular Biology of the Cell, 4th Edition. *Annals of Botany*, 91 (3), 401-405.
- Alemán, A. (2010). *Obtención y caracterización de hidrolizados y péptidos bioactivos a partir de gelatina de productos de la pesca*. (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, España.
- Alemán, A., Giménez, B., Pérez-Santín, E., Gómez-Guillén, M.C. and Montero, P. (2011a). Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate. *Food Chemistry*, 125, 334–341.
- Alemán, A., Pérez-Santín, E., Bordenave-Juchereau, S., Arnaudín, I., Gómez-Guillén, M.C. and Montero, P. (2011b). Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Research International*, 44 (4), 1044-1051.
- Alemán, A., Gómez-Guillén, M.C. and Montero, P. (2013). Identification of ace-inhibitory peptides from squid skin collagen after in vitro gastrointestinal digestion. *Food Research International*, 54, 790–795.
- Alemán, A., Mastrogiacomo, I., López-Caballero, M.E., Ferrari, B., Montero, M.P. and Gómez-Guillén, M.C. (2016). A novel functional wrapping design by complexation of ϵ -polylysine with liposomes entrapping bioactive peptides. *Food Bioprocess Technol.*, 9, 1113-1124.
- Altunkaya, A. (2014). Potential antioxidant activity of pomegranate peel and seed extracts and synergism with added phenolic antioxidants in a liposome system: a preliminary study. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 53, 121-131.
- Álvarez, I., De La Fuente, J., Cañeque, V., Lauzurica, S., Pérez, C., Díaz, M.T. (2009). Changes in the fatty acid composition of *M. longissimus dorsi* of lamb during storage in a high-oxygen

modified atmosphere at different levels of dietary vitamin E supplementation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (1), 140-146.

An, Y., You, J., Xiong, S. and Yin, T. (2018). Short-term frozen storage enhances cross-linking that was induced by transglutaminase in surimi gels from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chemistry*, 257, 216-222.

Arancibia, M.Y. (2014). *Recubrimientos activos procedentes de recursos infrautilizados y residuos de la industria para su aplicación en agroalimentación*. (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria. España.

Arancibia, M.Y., Alemán, A., Calvo, M.M., López-Caballero, M.E., Montero, P. and Gomez-Guillén, M.C. (2014). Antimicrobial and antioxidant chitosan solutions enriched with active shrimp (*Litopenaeus vannamei*) waste materials. *Food Hydrocolloids*, 35, 710-717.

Arancibia, M., López-Caballero, M.E., Gómez-Guillén, M.C. and Montero, P. (2015). Development of active films of chitosan isolated by mild extraction with added protein concentrates from shrimp waste. *Food Hydrocolloids*, 43, 91-99.

Arranz, E. & Corredig, M. (2017). *Invited review*: milk phospholipid vesicles, their colloidal properties, and potential as delivery vehicles for bioactive molecules. *J. Dairy Sci.*, 100, 4213-4222.

Arshinova, O.Y., Sanarova, E.V., Lantsova, A.V. and Oborotova, N.A. (2012). Drug synthesis methods and manufacturing technology. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 46 (4), 228-233.

Artursson, P. (1990). Epithelial transport of drugs in cell culture. A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive Caco-2 cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79 (6), 476-482.

Arvanitoyannis, I.S. & Kassaveti, A. (2008). Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. *International Journal of Food Science & Technology*, 43 (4), 726-745.

Augustyńska, D., Burda, K., Jemioła-Rzemińska, M. and Strzałka, K. (2016). Temperature-dependent bifurcation of cooperative interactions in pure and enriched in β -carotene DPPC liposomes. *Chem. Biol. Interact.*, 256, 236-248.

Badii, F. & Howell, N.K. (2002). Effect of antioxidants, citrate, and cryoprotectants on protein denaturation and texture of frozen cod (*Gadus morhua*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (7), 2053-2061.

Baeza, G., Sarriá, B., Bravo, L. and Mateos, R. (2017). Polyphenol content, *in vitro* bioaccessibility and antioxidant capacity of widely consumed beverages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98, 1397-1406.

Bailey, A.L. & Sullivan, S.M. (2000). Efficient encapsulation of DNA plasmids in small neutral liposomes induced by ethanol and calcium. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 1468 (1-2), 239-252.

Bangham, A.D., Standish, M.M. and Watkins, J.C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of molecular biology*, 13 (1), 238-252.

Basiri, S., Shekarforoush, S. S., Aminlari, M. and Akbari, S. (2015). The effect of pomegranate peel extract (PPE) on the polyphenol oxidase (PPO) and quality of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during refrigerated storage. *LWT - Food Science and Technology*, 60, 1025-1033.

- Bavarsad, N., Kouchak, M., Mohamadipour, P. and Sadeghi-Nejad, B. (2016). Preparation and physicochemical characterization of topical chitosan-based film containing griseofulvin-loaded liposomes. *J. of Advanced Pharm. Techn. & Research*, 7 (3), 91-98.
- Beas, V.E., Wagner, J.R., Crupkin, M. and Añón, M.C. (1990). Thermal Denaturation of Hake (*Merluccius hubbsi*) Myofibrillar Proteins. A Differential Scanning Calorimetric and Electrophoretic Study. *Journal of Food Science*, 55 (3), 683-687.
- Benzie, I.F.F. & Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Bermúdez-Soto, M.J., Tomás-Barberán, F.A. and García-Conesa, M.T. (2007). Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*, 102 (3), 865-874.
- Biltonen, R.L. & Lichtenberg, D. (1993). The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations. *Chemistry and Physics of Lipids*, 64 (1-3), 129-142.
- Blanco-Pascual, N., Fernández-Martín, F. and Montero, P. (2013). Effect of different protein extract from *Dosidicus gigas* muscle co-products on edible films development. *Food Hydrocolloids*, 33 (1), 118-131.
- Bligh, E.G., & Dyer, W.J. (1959). A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.
- Boelter, J.F. & Brandelli, A. (2016). Innovative bionanocomposite films of edible proteins containing liposome-encapsulated nisin and halloysite nanoclay. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 145, 740-747.
- Borges, A.F., Silva, C., Coelho, J.F.J. and Simoes, S. (2015). Oral films: Current status and future perspectives II — Intellectual property, technologies and market needs. *J. of Controlled Release*, 206, 108-121.
- Bryła, A., Lewandowicz, G. and Juzwa, W. (2015). Encapsulation of elderberry extract into phospholipid nanoparticles. *Journal of Food Engineering*, 167, 189-195.
- Calani, L., Dall'Asta, M., Derlindati, E., Scazzina, F., Bruni, R. and Del Rio, D. (2012). Colonic metabolism of polyphenols from coffee, green tea, and hazelnut skins. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 46 (Suppl 1), 95-99.
- Campo, L. & Tovar, C. (2008). Influence of the starch content in the viscoelastic properties of surimi gels. *Journal of Food Engineering*, 84 (1), 140-147.
- Campos, P.P., Fraceto, L.F. and Ferreira, M. (2018). Layer-by-layer films containing emodin or emodin encapsulated in liposomes for transdermal applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 162, 69-75.
- Cao, W., Zhang, C., Honh, P. and Ji, H. (2009). Optimising the free radical scavenging activity of shrimp protein hydrolysate produced with alcalase using response surface methodology. *International J. of Food Science and Technology*, 44, 1602-1608.
- Capitani, D., Sobolev, A.P., Di Tullio, V., Mannina, L. and Proietti, N. (2017). Portable NMR in food analysis. *Chem. Biol. Technol. Agric.*, 4:17, DOI 10.1186/s40538-017-0100-1.
- Carbonell-Capella, J.M., Buniowska, M., Barba, F.J., Esteve, M.J. and Frígola, A. (2014). Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 155-171.

- Cardoso, C., Mendes, R., Pedro, S. and Nunes, M.L. (2008). Quality changes during storage of fish sausages containing dietary fiber. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 17 (1), 73-95.
- Cardoso, C.L., Mendes, R.O., Saraiva, J.A., Vaz-Pires, P.R. and Nunes, M.L. (2010). Quality characteristics of high pressure-induced hake (*Merluccius capensis*) protein gels with and without MGTase. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 19, 193-213.
- Careche, M., Mazo, M.L. and Fernández-Martín, F. (2002). Extractability and thermal stability of frozen hake (*Merluccius merluccius*) fillets stored at -10 and -30° C. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 1791–1799.
- Careche, M., Borderías, A.J. and Sánchez-Alonso, I. (2004). Method of producing a functional protein concentrate from cephalopod muscle and product thus obtained, which is used in the production of analog products and other novel products. (PCT 24/06/04). Patent No. W2004/052117.
- Carpenter, R.P., Lyopn, D.H. and Hasdell, T.A. (2000). Análisis sensorial en el Desarrollo y control de la Calidad de alimentos. Editorial Acirbia, S.A. I.S.B.N. 84-200-0988-1.
- Carvalho, J., Soares, M., Castro, C., Mota, A., Ribeiro, A., Araújo, J. and Vilarinho, C. (2018). Development of bioplastic film for application in the footwear industry. In: Machado, J., Soares, F. and Veiga, G. (eds.). Innovation, Engineering and Entrepreneurship. HELIX 2018. Lecture Notes in Electrical Engineering, vol. 505. Springer, Cham.
- Catalá, A. (2009). Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxyalkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem. Phys. Lipids*, 157, 1-11.
- Catalan-Latorre, A., Ravaghi, M., Manca, M.L., Caddeo, C., Marongiu, F., Ennas, G., Escribano-Ferrer, E., Peris, J.E., Diez-Sales, O., Fadda, A.M. and Manconi, M. (2016). Freeze-dried eudragit-hyaluronan multicompartiment liposomes to improve the intestinal bioavailability of curcumin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 107, 49-55.
- Chang, T.C., Shiah, H.S., Yang, C.H., Yeh, K.H., Cheng, A.L., Shen, B.N., Wang, Y.W., Yeh, C.G., Chiang, N.J., Chang, J.Y. and Chen, L.T. (2015). Phase I study of nanoliposomal irinotecan (PEP02) in advanced solid tumor patients. *Cancer Chemother Pharmacol*, 75 (3), 579-586.
- Charcosset, C., Juban, A., Valour, J.-P., Urbaniak, S. and Fessi, H. (2015). Preparation of liposomes at large scale using the ethanol injection method: Effect of scale-up and injection devices. *Chemical Engineering Research and Design*, 94, 508–515.
- Chaurand, L.D.E., Villasante, F.V., Soria, H.N., Farnés, O.C., and López S.L. (2013). Perfil de aminoácidos del músculo de *Macobrachium tenellum* y cómputo químico de proteínas usadas en su alimentación. *Bol. Inst. Pesca*, 39 (4), 369-378.
- Chen, C., Han, D., Cai, C. and Tang, X. (2010). An overview of liposome lyophilization and its future potential. *J. Contr. Release*, 142, 299-311.
- Cheng, J., Wei, N., Lopez-Garcia, M., Ambrose, D., Lee, J., Annelin, C. and Peterson, T. (2017). Development and evaluation of resveratrol, Vitamin E and epigallocatechin gallate loaded lipid nanoparticles for skin care applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 117, 286-291.
- Cheung, I.W.Y. & Li-Chan, E.C.Y. (2010). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity and bitterness of enzymatically-produced hydrolysates of shrimp (*Pandalopsis dispar*) processing by products investigated by Taguchi design. *Food Chemistry*, 122 (4), 1003-1012.

- Chiou, J.-S., Krishna, P.R., Kamaya, H. and Ueda, I. (1992). Alcohols dehydrate lipid membranes: an infrared study on hydrogen bonding. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1110, 225-233.
- Chirra, H.D. & Desai, T.A. (2012). Emerging microtechnologies for the development of oral drug delivery devices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64 (14), 1569-1578.
- Chiu, C.H., Chang, C.C., Lin, S.T., Chyau, C.C. and Peng, R.Y. (2016). Improved hepatoprotective effect of liposome-encapsulated astaxanthin in lipopolysaccharide-induced acute hepatotoxicity. *Int. J. Mol. Sci.*, 17 (7), 1128.
- Christensen, D., Foged, C., Rosenkrands, I., Nielsen, H.M., Andersen, P. and Agger, E.M. (2007). Trehalose preserves DDA/TDB liposomes and their adjuvant effect during freeze-drying. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*, 1768 (9), 2120-2129.
- Chollet, E., Sebti, I., Martial-Gros, A. and Degraeve, P. (2008). Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity. *Food Control*, 19 (10), 982-989.
- Chun, J.-Y., Min, S.-G. and Jo, Y.-J. (2017). Production of low molecular collagen peptides-loaded liposomes using different charged lipids. *Chemistry and Physics of Lipids*, 209, 1-8.
- Contreras, M., Carrón, R., Montero, M.J., Ramos, M. and Recio, I. (2009). Novel casein derived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal*, 19, 566-573.
- Cobb, B.F., Vanderzant, C. and Hyder, K. (1974). Effect of ice storage on the free amino acid contents of tails of white shrimp (*Penaeus setiferus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22 (6), 1052-1055.
- Comisión Europea. (2015). Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo, al Consejo, al Comité Económico y Social Europeo y al Comité de las Regiones. Cerrar el círculo: un plan de acción de la UE para la economía circular. Bruselas.
- Cook, S.L., Methven, L., Parker, J.K. and Khutoryanskiy, V.V. (2018). Polysaccharide food matrices for controlling the release, retention and perception of flavours. *Food Hydrocolloids*, 79, 253-261.
- Cuadros-Moreno, A., Pimentel, R.C., Martín-Martínez, E.S. y Fernandez, J.Y. (2014). Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. *Lat. Am. J. Phys. Educ.*, 8 (4), 4314.
- Cudennec, B., Ravallec-Plé, R., Courois, E. and Fouchereau-Peron, M. (2008). Peptides from fish and crustacean by-products hydrolysates stimulate cholecystokinin release in STC-1 cells. *Food Chemistry*, 111 (4), 970-975.
- Cui, H., Yuan, L. and Lin, L. (2017a). Novel chitosan film embedded with liposome-encapsulated phage for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7 in beef. *Carbohydrate Polymers*, 177, 156-164.
- Cui, H., Yuan, L., Li, W. and Lin, L. (2017b). Edible film incorporated with chitosan and *Artemisia annua* oil nanoliposomes for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on cherry tomato. *International Journal of Food Science and Technology*, 52, 687-698.
- D'Archivio, M., Filesì, C., Varì, R., Sczzocchio, B. and Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 1321-1342.

- Da Silva Malheiros, P., Micheletto, Y.M.S., da Silveira, N.P. and Brandelli, A. (2010). Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing the antimicrobial peptide nisin. *Food Research International*, 43 (4), 1198-1203.
- Da Silva Malheiros, P., Daroit, D.J. and Brandelli, A. (2011). Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 21 (6), 284-292.
- Da Silva, M.P., Sant'Anna, V., Da Silva, B.M., Brandelli, A. and Gombossy de Melo, F.B.D. (2012). Effect of liposome-encapsulated nisin and bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* growth in Minas frescal cheese. *International journal of food microbiology*, 156 (3), 272-277.
- Dag, D. & Oztop, M.H. (2017). Formation and Characterization of Green Tea Extract Loaded Liposomes. *Journal of Food Sciences*, 82 (2), 463-470.
- Dashwood, R.H. (2007). Frontiers in Polyphenols and Cancer Prevention. *The Journal of Nutrition*, 137, 267S-269S.
- Dawidowicz, A.L. & Typek, R. (2011). The influence of pH on the thermal stability of 5-O-caffeoylquinic acids in aqueous solutions. *Eur. Food Res. Technol.*, 233, 223-232.
- Day, J. W., Moerschbaecher, M., Pimentel, D. and Hall, C. (2014). Sustainability and place: How emerging mega-trends of the 21st century will affect humans and nature at the landscape level. *Ecological Engineering*, 65, 33-48.
- Doucet, D., Otter, E.O., Gauthier, S.F. and Foegeding, E.A. (2003). Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey protein by Alcalase: Peptides identification and determination of enzyme specificity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6300-6308.
- Drazenovic, J., Wang, H., Roth, K., Zhang, J., Ahmed, S., Chen, Y., Bothun, G. and Wunder, S.L. (2015). Effect of lamellarity and size on calorimetric phase transitions in single component phosphatidylcholine vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*, 1848 (2), 532-543.
- Du, H.-H., Liang, R., Han, R.-M., Zhang, J.-P. and Skibsted, L.H. (2015). Astaxanthin protecting membrane integrity against Photosensitized oxidation through Synergism with other carotenoids. *J. Agric. Food Chem.*, 63, 9124-9130.
- Dublán, O. (2006). *Evaluación de los cambios estructurales y fisicoquímicos del manto de calamar gigante (Dosidicus gigas) durante el almacenamiento en refrigeración o congelación*. (Tesis doctoral). Universidad Autónoma Metropolitana. Departamento de Biotecnología. México D.F.
- Dupas, C., Marsset Baglieri, A., Ordonaud, C., Tomé, D. and Maillard, M.N. (2006). Chlorogenic acid is poorly absorbed, independently of the food matrix: A Caco-2 cells and rat chronic absorption study. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50 (11), 1053-1060.
- Ebrahimi, B., Mohammadi, R., Rouhi, M., Mortazavian, A.M., Shojaee-Aliabadi, S. and Koushki, M.R. (2018). Survival of probiotic bacteria in carboxymethyl cellulose-based edible film and assessment of quality parameters. *LWT-Food Science and Technology*, 87, 54-60.
- Erikson, U., Standal, I.B., Aursand, I.G., Veliyulin, E. and Aursand, M. (2012). Use of NMR in fish processing optimization: a review of recent progress. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 50, 471-480.
- Fabra, M.J., Talens, P. and Chiralt, A. (2010). Influence of calcium on tensile, optical and water permeability properties of sodium caseinate edible films. *J. of Food Engineering*, 96 (3) 356-364.

- FAO. (2010a). *Report of the technical consultation to develop international guidelines on bycatch management and reduction of discards*. Rome, 6-10 December: FAO, Fisheries and Aquaculture Report 957, ISBN 978-92-5-106764-2.
- FAO. (2010b). *The state of world fisheries and aquaculture 2010*. Rome: FAO. ISBN 978-92-5-106675-1.
- Farah, J.S., Silva, M.C., Cruz, A.G. and Calado, V. (2018). Differential calorimetry scanning current background and application in authenticity of dairy products. *Current Opinion in Food Science*, 22, 88-94.
- Farrell, T.L., Gómez-Juaristi, M., Poquet, L., Redeuil, K., Nagy, K., Renouf, M. and Williamson, G. (2012). Absorption of dimethoxycinnamic acid derivatives *in vitro* and pharmacokinetic profile in human plasma following coffee consumption. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56 (9), 1413-1429.
- Fathi, M., Mozafari, M. and Mohebbi, M. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends Food Science Technology*, 23, 13-27.
- Feng, C., Wang, Z., Jiang, C., Kong, M., Zhou, X., Li, Y., Cheng, X. and Chen, X. (2013). Chitosan/o-carboxymethyl chitosan nanoparticles for efficient and safe oral anticancer drug delivery: *In vitro* and *in vivo* evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 457 (1), 158-167.
- Feng, Y., Sun, C., Yuan, Y., Zhu, Y., Wan, J., Firempong, C.K., Omari-Siaw, E., Xu, Y., Pu, Z., Yu, J. and Xu, X. (2016). Enhanced oral bioavailability and *in vivo* antioxidant activity of chlorogenic acid *via* liposomal formulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 501 (1-2), 342-349.
- Fernandez-Avila, C., Arranz, E., Guri, A., Trujillo, A.J., Corredig, M. (2016). Vegetable protein isolate stabilized emulsions for enhanced delivery of conjugated linoleic acid in Caco-2 cells. *Food Hydrocoll.*, 55, 144–154.
- Fernández-Martín, F., Pérez-Mateos, M. and Montero, P. (1998). Effect of pressure/heat combinations on blue whiting (*Micromesistius poutassou*) washed mince: thermal and mechanical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3257-3264.
- Frenzel, M. & Steffen-Heins, A. (2015). Impact of quercetin and fish oil encapsulation on bilayer membrane and oxidation stability of liposomes. *Food Chemistry*, 185, 48-57.
- Füredi, P., Kovács, K., Ludányi, K., Antal, I. and Klebovich, I. (2016). Development and characterization of voriconazole loaded nanoparticles for parenteral delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 510 (1), 159-163.
- Gee, J.M., DuPont, M.S., Rhodes, M.J. and Johnson, I.T. (1998). Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Radical Biology & Medicine*, 25 (1), 19-25.
- Genin, N. & René, F. (1995). Analyse du rôle de la transition vitreuse dans les procédés de conservation agroalimentaires. *Journal of Food Engineering*, 26, 391-408.
- Gerelli, Y., Barbieri, S., Di Bari, M.T., Deriu, A., Cantù, L., Brocca, P., Sonvico, F., Colombo, P., May, R. and Motta, S. (2008). Structure of self-organized multilayer nanoparticles for drug delivery. *Langmuir*, 24, 11378-11384.
- Gibbs, B.F., Kermasha, S., Alli, I. and Mulligan, C.N. (1999). Encapsulation in the food industry: A review. *International journal of food sciences and nutrition*, 50 (3), 213-224.

- Giménez, B., Gómez-Estaca, J., Alemán, A., Gómez-Guillén, M.C. and Montero, P. (2009). Improvement of the antioxidant properties of squid skin gelatin films by the addition of hydrolysates from squid gelatin. *Food Hydrocolloids*, 23, 1322-1327.
- Giménez, B., López-Caballero, M.E., Montero, M.P. and Gómez-Guillén, M.C. (2012). Antioxidant Peptides from Marine Origin. In: Cirilo, G. & Lemma, F. *Antioxidant Polymers: Synthesis, Properties, and Applications* (pp. 203-257). Wiley Online Library.
- Giménez, B., Moreno, S., López-Caballero, M.E., Montero, P., Gómez-Guillén, M.C. (2013). Antioxidant properties of green tea extract incorporated to fish gelatin films after simulated gastrointestinal enzymatic digestion. *LWT - Food Science and Technology*, 53, 445-451.
- Giraudó, M., Ugarte, M., Sánchez, H., Beaufort, C., Álvarez, R. and Menéndez, J. (2010). Actualización: alimentos que reducen la absorción del colesterol. *Actualización en Nutrición*, 11 (2), 128-139.
- Gómez-Estaca, J., Montero, P., Fernández-Martín, F., Calvo, M.M. and Gómez-Guillén, M.C. (2016). The effect of high-pressure treatment on functional components of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cephalothorax. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 34, 154–160.
- Gómez-Estaca, J., Calvo, M.M., Álvarez-Acero, I., Montero, P. and Gómez-Guillén, M.C. (2017). Characterization and storage stability of astaxanthin esters, fatty acid profile and α -tocopherol of lipid extract from shrimp (*L. vannamei*) waste with potential applications as food ingredient. *Food Chemistry*, 216, 37–44.
- Gómez-Juaristi, M. (2015). *Metabolismo de flavonoides y ácidos hidroxicinámicos de la dieta. Estudios de transporte in vitro y de disponibilidad en humanos*. (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid, España.
- Gómez-Ruiz, J.A., Recio, I. and Belloque, J. (2004). ACE-Inhibitory activity and structural properties of peptide Asp- Lys-Ile-His-Pro [b-CN f(47-51)]. Study of the peptide forms synthesized by different methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6315-6319.
- Gong, K.-J., Shi, A.-M., Liu, H.-Z., Liu, L., Hu, H., Yang, Y., Adhikaric, B. and Wang, Q. (2016). Preparation of nanoliposomes loaded with peanut peptide fraction: stability and bioavailability. *Food Funct.*, 7, 2034-2042.
- Guillén, M.D. & Cabo, N. (2004). Study of the effects of smoke flavourings on the oxidative stability of the lipids of pork adipose tissue by means of Fourier transform infrared spectroscopy. *Meat Science*, 66 (3), 647-657.
- Guillen, J., Holmes, S.J., Carvalho, N., Casey, J., Dörner, H., Gibin, M., Mannini, A., Vasilakopoulos, P. and Zanzi, A. (2018). A review of the European Union Landing Obligation focusing on its implications for fisheries and the environment. *Sustainability*, 10, 900, doi:10.3390/su10040900.
- Gupta, S., Bansal, R., Gupta, S., Jindal, N. and Jindal, A. (2013). Nanocarriers and nanoparticles for skin care and dermatological treatments. *Indian Dermatol. Online J.*, 4, 267.
- Guerard, F., Sumaya-Martínez, M.T., Laroque, D., Chabeaud, A. and Dufossé, L. (2007). Optimization of free radical scavenging activity by response surface methodology in the hydrolysis of shrimp processing discards. *Process Biochemistry*, 42, 1486-1491.
- Gültekin-Özgüven, M., Karadağ, A., Duman, S., Özkal, B. and Özçelik, B. (2016). Fortification of dark chocolate with spray dried black mulberry (*Morus nigra*) waste extract encapsulated in chitosan-coated liposomes and bioaccessability studies. *Food Chemistry*, 201, 205-212.

- Gumisiriza, R., Mshandete, A.M., Thomas, M.S., Rubindamayugi, F.K. and Kivaisi, A.K. (2009). Nile perch fish processing waste along Lake Victoria in East Africa: Auditing and characterization. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 3 (1), 013-020.
- Guner, S. & Oztop, M.H. (2017). Food grade liposome systems: effect of solvent, homogenization types and storage conditions on oxidative and physical stability. *Colloid. Surface Physicochem. Eng. Aspect*, 513, 468-478.
- Gustafsson, J., Nordenswan, E. and Rosenholm, J.B. (2003). Effect of pH on the sedimentation, ζ -potential, and rheology of anatase suspensions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 212 (2–3), 235-247.
- Guzmán, J., Flores, R., Gómez, J., Soberanes, E., Escarela, M. and D'Hyver, C. (2009). Osteoporosis. Conceptos básicos para la práctica diaria. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 14 (3), 128-140.
- Haghju, S., Beigzadeh, S., Almasi, H. and Hamishehkar, H. (2016). Chitosan films incorporated with nettle (*Urtica dioica* L.) extract-loaded nanoliposomes: I. Physicochemical characterization and antimicrobial properties. *Journal of Microencapsulation*, 33 (5), 438-448.
- Hama, S., Uenishi, S., Yamada, A., Ohgita, T., Tsuchiya, H., Yamashita, E. and Kogure, K. (2012). Scavenging of hydroxyl radicals in aqueous solution by astaxanthin encapsulated in liposomes. *Biol. Pharmaceut. Bull.*, 35 (12), 2238-2242.
- Harnedey, P.A. & FitzGerald, R.J. (2012). Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: a review. *Journal of Functional Foods*, 4, 6-24.
- Harrison, J.M. (1985). Brownian Motion and Stochastic Flow Systems. *Applied Stochastic Models and Data Analysis*, 140.
- Has, C., Phapal, S.M. and Sunthar, P. (2018). Rapid single-step formation of liposomes by flow assisted stationary phase interdiffusion. *Chemistry and Physics of Lipids*, 212, 144-151.
- He, Y., Luo, L., Liang, S., Long, M. and Xu, H. (2018). Influence of probe-sonication process on drug entrapment efficiency of liposomes loaded with a hydrophobic drug. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 1-5.
- Heinemann, R.J.B., Carvalho, R.A. and Favaro-Trindade, C.S. (2013). Orally disintegrating film (ODF) for delivery of probiotics in the oral cavity - Development of a novel product for oral health. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 19, 227-232.
- Hemanthkumar, M. & Spandana, V. (2011). Liposomal encapsulation technology a novel drug delivery system designed for ayurvedic drug preparation. *IRJP*, 2 (10), 4-7.
- Herrera, F., Betancur, D. and Segura, M.R. (2014). Compuestos bioactivos de la dieta con potencial en la prevención de patologías relacionadas con sobrepeso y obesidad; péptidos biológicamente activos. *Nutr. Hosp.*, 29 (1), 10-20.
- Hills, B.P., Wright, K.M. and Belton, P.S. (1989). N.M.R. studies of water proton relaxation in Sephadex bead suspensions. *Molecular Physics*, 67 (1), 193–208.
- Hirose, A., Terauchi, M., Osaka, Y., Akiyoshi, M., Kato, K. and Miyasaka, N. (2018). Effect of soy lecithin on fatigue and menopausal symptoms in middle-aged women: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Nutrition Journal*, 17 (4), doi: 10.1186/s12937-018-0314-5.
- Hoogevest, P.V. & Wendel, A. (2014). The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 116, 1088-1107.

- Hosomi, R., Fukunaga, K., Fukao, M., Yoshida, M., Arai, H., Kanda, S., Nishiyama, T. and Kanada, T. (2012). Combination Effect of Phospholipids and *n*-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Rat Cholesterol Metabolism. *Food Sci. Biotechnol.*, 21 (5), 1335-1342.
- Hu, B., Yao, W. and Liu, N. (2010). Optimization of preparation condition for procyanidine liposomes. *Journal of Northeast Agricultural University*, 9, 022.
- Imran, M., Revol-Junelles, A., René, N., Jamshidian, M., Akhtar, M.J., Arab-Tehrany, E., Jacquot, M. and Desobry, S. (2012). Microstructure and physicochemical evaluation of nano-emulsion-based antimicrobial peptides embedded in bioactive packaging films. *Food Hydrocolloids*, 29 (2), 407-419.
- Ismail, T., Sestili, P. and Akhtar, S. (2012). Pomegranate peel and fruit extracts: A review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *Journal of Ethnopharmacology*, 143, 397-405.
- Ivarsson, D. & Wahlgren, M. (2012). Comparison of *in vitro* methods of measuring mucoadhesion: Ellipsometry, tensile strength and rheological measurements. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 92, 353–359.
- Jacques, H., Deshaies, Y. and Savoie, L. (1986). Relationship between dietary proteins, their *in vitro* digestion products, and serum cholesterol in rats. *Arteriosclerosis*, 61, 89-96.
- Jäger, R., Purpura, M. and Kingsley, M. (2007). Phospholipids and sports performance. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 4 (5), doi: 10.1186/1550-2783-4-5.
- Jaquet, M., Rochat, I., Moulin, J., Cavin, C. and Bibiloni, R. (2009). Impact of coffee consumption on the gut microbiota: a human volunteer study. *International Journal of Food Microbiology*, 130 (2), 117-121.
- Jeon, S., Yoo, C.Y. and Park, S.N. (2015). Improved stability and skin permeability of sodium hyaluronate-chitosan multilayered liposomes by Layer-by-Layer electrostatic deposition for quercetin delivery. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 129, 7–14.
- Ji, W., Zhang, C. and Ji, H. (2017). Purification, identification and molecular mechanism of two dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides from Antarctic krill (*Euphausia superba*) protein hydrolysate. *J. of Chromatography B*, 1064, 56-61.
- Jia, H.-J., Jia, F.-Y., Zhu, B.-J. and Zhang, W.-P. (2017). Preparation and characterization of glycyrrhetic-acid loaded PEG-modified liposome based on PEG-7 glyceryl cocoate. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 1600010. doi:10.1002/ejlt.201600010.
- Johansson, H., Svartström, O., Phadnis, P., Engman, L. and Ott, M.K. (2010). Exploring a synthetic organoselenium compound for antioxidant pharmacotherapy-toxicity and effects on ROS-production. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 18 (5), 1783-1788.
- Karaś, M., Jakubczyk, A., Szymanowska, U., Złotek, U. and Zielińska, E. (2017). Digestion and bioavailability of bioactive phytochemicals. *International Journal of Food Science and Technology*, 52, 291-305.
- Karn, P.R., Jin, S.E., Lee, B.J., Sun, B.K., Kim, M.S., Sung, J.H. and Hwang, S.J. (2014). Preparation and evaluation of cyclosporine A-containing proliposomes: a comparison of the supercritical antisolvent process with the conventional film method. *Int. J. Nanomedicine*, 9, 5079-5091.
- Kato, N., Ishijima, A., Inaba, T., Nomura, F., Takeda, S. and Takiguchi, K. (2015). Effects of lipid composition and solution conditions on the mechanical properties of membranes vesicles. *Membranes*, 5, 22-47.

- Ketnawa, S., Martínez-Álvarez, O., Gómez-Estaca, J., Gómez-Guillén, M.C., Benjakul, S. and Rawdkuen, S. (2016). Obtaining of functional components from cooked shrimp. *Food Bioscience*, 15, 55-63.
- Kheadr, E.E., Vuillemand, J.-C. and El Deeb, S.A. (2000). Accelerated Cheddar cheese ripening with encapsulated proteinases. *International Journal of Food Science and Technology*, 35 (5), 483-495.
- Khorasani, S., Danaei, M. and Mozafari, M.R. (2018). Nanoliposome technology for the food and nutraceutical industries. *Trends in Food Science & Technology*, 79, 106-115.
- Kim, S.K., Kim, Y.T., Byun, H.G., Nam, K.S., Joo, D.S. and Shahidi, F. (2001). Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1984-1989.
- Kim, S.-K., Ngo, D.-H. and Vo, T.-S. (2012). Marine Fish-Derived Bioactive Peptides as Potential Antihypertensive Agents. *Advances in Food and Nutrition Research*, 65, 249-260.
- Kirtil, E. & Oztop, M.H. (2016). ¹H Nuclear Magnetic Resonance Relaxometry and Magnetic Resonance Imaging and Applications in Food Science and Processing. *Food Eng. Rev.*, 8, 1-22.
- Kirwan, M.J. & Strawbridge, J.W. (2003). Plastics in food packaging. *Food Packaging Technology*, 17, 174-240.
- Knees, S.G. (2003). Crithmum. In: Nieto, G., Jury, S.L. and Herrero, A. (eds.). *Flora ibérica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Vol. X: Araliaceae-Umbelliferae* (195-197). Real Jardín Botánico, C.S.I.C. Madrid, España.
- Konishi, Y. & Kobayashi, S. (2004). Transepithelial transport of chlorogenic acid, caffeic acid, and their colonic metabolites in intestinal caco-2 cell monolayers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (9), 2518-2526.
- Koster, K.L., Lei, Y.P., Anderson, M., Martin, S. and Bryant, G. (2000). Effects of vitrified and nonvitrified sugars on phosphatidylcholine fluid-to-gel phase transitions. *Biophys. J.*, 78, 1932-1946.
- Krishnamurthy, K. & Shivashankar, K. (1975). Soybean production in Karnataka. *UAS Tech. Series*, No. 12.
- Küllenberg, D., Taylor, L.A., Schneider, M. and Massing, U. (2012). Health effects of dietary phospholipids. *Lipids on Health and Disease*, 11 (3), doi: 10.1186/1476-511X-11-3.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), 680-685.
- Lamba, O.P., Lal, S., Cecilia Yappert, M., Lou, M.F. and Borchman, D. (1991). Spectroscopic detection of lipid peroxidation products and structural changes in a sphingomyelin model system. *Biochim. Biophys. Acta Lipids Lipid. Metabol.*, 1081, 181-187.
- Lanier, T.C., Yongsawatdigul, J. and Carvajal-Rondanelli, P. (2013). Surimi Gelation Chemistry. En: Park, J.W. (Ed.). *Surimi and Surimi Seafood* (pp. 101–140). CRC Press. Taylor & Francis Group.
- Laurén, P., Paukkonen, H., Lipiäinen, T., Dong, Y., Oksanen, T., Räikkönen, H., Ehlers, H., Laaksonen, P., Yliperttula, M. and Laaksonen, T. (2018). Pectin and mucine enhance the adhesion of drug loaded nanofibrillated cellulose films. *Pharm. Res.*, 35: 145.

- Laverman, P., Van Bloois, L., Boerman, O.C., Oyen, W.J.G., Corstens, F.H.M. and Storm, G. (2000). Lyophilization of Tc-99m-HYNIC labeled PEG-liposomes. *Journal of Liposome Research*, 10 (2-3), 117-129.
- Laye, C., McClements, D.J. and Weiss, J. (2008). Formation of biopolymer-coated liposomes by electrostatic deposition of chitosan. *Journal of Food Science*, 73 (5), N7-N15.
- Lee, A., McVey, J., Faustino, P., Lute, S., Sweeney, N., Pawar, V., Khan, M., Brorson, K. and Hussong, D. (2010). Use of hydrogenophaga pseudoflava penetration to quantitatively assess the impact of filtration parameters for 0.2-micrometerpore- size filters. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (3), 695-700.
- Lee, W.-J., Weng, S.-H. and Su, N.-W. (2015). Individual phosphatidylcholine species analysis by RP-HPLC-ELSD for determination of polyenylphosphatidylcholine in lecithins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63 (15), 3851–3858.
- Lefèvre, T., Toscani, S., Picquart, M. and Dugué, J. (2002). Crystallization of water on multilamellar vesicles. *Eur. Biophys. J.*, 31, 126-135.
- Li, R., Deng, L., Cai, Z., Zhang, S., Wang, K., Li, L., Ding, S. and Zhou, C. (2017). Liposomes coated with thiolated chitosan as drug carriers of curcumin. *Materials Science and Engineering C*, 80, 156-164.
- Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J. and Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, 96 (2), 254-260.
- Li, J., Wang, X., Zhang, T., Wang, C., Huang, Z., Luo, X. and Deng, Y. (2015). A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10, 81–98.
- Li-Chan, E.C.Y., Hunag, S.L., Jao, C.L., Ho, K.P. and Hsu, K.C. (2012). Peptides derived from Atlantic salmon skin gelatin as dipeptidyl-peptidase IV inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (4), 973-978.
- Lin, Q., Liang, R., Williams, P.A. and Zhong, F. (2018). Factors affecting the bioaccessibility of β -carotene in lipid-based microcapsules: digestive conditions, the composition, structure and physical state of microcapsules. *Food Hydrocolloids*, 77, 187-203.
- Liu, K.S. (1997). Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization. New York, NY, USA. Springer.
- Liu, J., Abdelmagid, S.A., Pinelli, C.J., Monk, J.M., Liddle, D.M., Hillyer, L.M., Hucik, B., Silva, A., Subedi, S., Wood, G.A., Robinson, L.E., Muller, W.J. and Ma, D.W.L. (2017). Marine fish oil is more potent than plant based n-3 polyunsaturated fatty acids in the prevention of the mammary tumours. *The Journal of Nutrition Biochemistry*, 55, 41-52.
- Liu, C., Yang, S., Liu, W., Wang, R., Wan, J. and Liu, W. (2010). Preparation and characterization of medium-chain fatty acid liposomes by lyophilization. *Journal of Liposome Research*, 20 (3), 183-190.
- Livney, Y.D. (2015). Nanostructured delivery systems in food: latest developments and potential future directions. *Curr. Opin. Food Sci.*, 3, 125-135.
- Lopes de Azambuja, C.R., Gomes dos Santos, L., Rodrigues, M.R., Rodrigues, R.F.M., Ferreira da Silveira, E., Azambuja, J.H., Flores, A.F.C., Horn, A.P., Dora, C.L., Muccillo-Baisch, A.L., Braganhol, E., Pinto, L., Parize, A.L. and Rodrigues de Lima, V. (2015). Physico-chemical characterization of

- asolectin-genistein liposomal system: An approach to analyze its *in vitro* antioxidant potential and effect in glioma cells viability. *Chemistry and Physics of Lipids*, 193, 24-35.
- López-Caballero, M.E., Giménez, B., Gómez-Guillén, M.C. and Montero, P. (2013). Valorization and integral use of seafood by-products. Chapter XIV. In: Texeira, J. & Vicente, A. Engineering Aspects of Food Biotechnology (pp. 367-413). CRC Press/Taylor & Francis. ISBN: ISBN-13:978-1-4398-9545-0.
- Maes, M., Scharpé, S. and De Meester, I. (2007). Dipeptidyl peptidase II (DPPII), a review. *Clinica Chimica Acta*, 380 (1–2), 31-49.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. and Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 79, 727-747.
- Manaia, E.B., Abuçafy, M.P., Chiari-Andréo, B.G., Silva, B.L., Oshiro, J.A. and Chiavacci, L.A. (2017). Physicochemical characterization of drug nanocarriers. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 4991-5011.
- Manca, M.L., Zaru, M., Manconi, M., Lai, F., Valenti, D., Sinico, C. and Fadda, A.M. (2013). Glycosomes: A new tool for effective dermal and transdermal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 455, 66-74.
- Manca, M.L., Manconi, M., Zaru, M., Valenti, D., Peris, J.E., Matricardi, P., Maccioni, A.M. and Fadda, A.M. (2017). Glycosomes: investigation of role of 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DMPC) on the assembling and skin delivery performances. *International Journal of Pharmaceutics*, 532, 401-407.
- Mannock, D.A., Lewis, R.N.A.H. and McElhaney, R.N. (2010). A calorimetric and spectroscopic comparison of the effects of ergosterol and cholesterol on the thermotropic phase behaviour and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1798, 376-388.
- Martelo-Vidal, M.J., Guerra-Rodríguez, E., Pita-Calvo, C. and Vázquez, M. (2016). Reduced-salt restructured European hake (*Merluccius merluccius*) obtained using microbial transglutaminase. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 38, 182-188.
- Masci, A., Coccia, A., Lendaro, E., Mosca, L., Paolicelli, P. and Cesa, S. (2016). Evaluation of different extraction methods from pomegranate whole fruit and peels and the antioxidant and antiproliferative activity of the polyphenolic fraction. *Food Chemistry*, 202, 59-69.
- Mašek, J., Lubasová, D., Lukáč, R., Turánek-Knotigová, P., Kulich, P., Plocková, J., Mašková, E., Procházka, L., Koudelka, Š., Sasithorn, N., Gombos, J., Bartheldyová, E., Hubatka, F., Raška, M., Miller, A.D. and Turánek, J. (2017). Multi-layered nanofibrous mucoadhesive films for bucal and sublingual administration of drug-delivery and vaccination nanoparticles important step towards effective mucosal vaccines. *J. of Controlled Release*, 249, 183-195.
- Matilla, B., Mauriz, J.L., Culebras, J.M., González-Gallego, J. and González, P. (2002). La glicina: un nutriente antioxidante protector celular. *Nutrición Hospitalaria*, 17 (1), 2-9.
- Matsumoto, N., Okushio, K. and Hara, Y. (1998). Effect of black tea polyphenols on plasma lipids in cholesterolfed rats. *Journal of Nutritional Sciences and Vitaminology*, 44 (2), 337-342.
- McClements, D.J. (2013). Utilizing food effects to overcome challenges in delivery of lipophilic bioactives: Structural design of medical and functional foods. *Expert opinion of drug delivery*, 10 (12), 1621-1632.

- McClements, D.J. (2015). Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems. *Advances in colloid and interface science*, 219, 27-53.
- McClements, D.J. (2016). Interfacial properties and their characterization. In: McClements, D.J. (3rd ed.). *Food emulsions: Principles, practices, and techniques* (pp. 185-244). Florida, EEUU: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- McClements, D.J. & Xiao, H. (2017). Designing food structure and composition to enhance nutraceutical bioactivity to support cancer inhibition. *Seminars in Cancer Biology*, 46, 215-226.
- McNamara, D.J. (1995). Dietary cholesterol and the optimal diet for reducing risk of atherosclerosis. *The Canadian journal of cardiology*, 11 (Suppl G), 123G-126G.
- Memoli, A., Palermi, L.G., Travagli, V. and Alhaique, F. (1995). Egg and soya phospholipids-sonication and dialysis: a study on liposome characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, 117, 159-163.
- Méndez, N. & Uribe, M. (2008). Inhibición de la absorción intestinal de colesterol. Una nueva estrategia para el tratamiento médico de la litiasis biliar de colesterol. *Medicina Universitaria*, 10 (41), 230-234.
- Mendis, E., Rajapakse, N. and Kim, S. (2005). Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (3), 581-587.
- Mente, E., Coutteau, P., Houlihan, D., Davidson, I. and Sorgeloos, P. (2002). Protein turnover, amino acid profile and amino acid flux in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*: effects of dietary protein source. *Journal of Experimental Biology*, 205 (20), 3107-3122.
- Meot-Duros, L. & Magne, C. (2009). Antioxidant activity and phenol content of *Crithmum maritimum* L. leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47 (1), 37-41.
- Meure, L.A., Foster, N.R. and Dehghani, F. (2008). Conventional and dense gas techniques for the production of liposomes: A review. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 9 (3), DOI: 10.1208/s12249-008-9097-x.
- Michelon, M., Mantovani, R.A., Sinigaglia-Coimbra, R., de la Torre, L.G. and Cunha, R.L. (2016). Structural characterization of β -carotene-incorporated nanovesicles produced with non-purified phospholipids. *Food Research International*, 79, 95-105.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. (2013). Programa Estatal de Prevención de Residuos 2014-2020. Madrid.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. (2015). Plan Estatal Marco de Gestión de Residuos (PEMAR) 2016-2022. Madrid.
- Minkiewicz, P., Dziuba, J., Iwaniak, A., Dziuba, M. and Darewicz, M. (2008). BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences. *Journal of AOAC International*, 91 (4), 965-980.
- Miranda, G., Ventura, J., Suárez, S. y Fuertes, C. (2007). Actividad citotóxica y antioxidante de los productos de la reacción de Maillard de los sistemas modelo D-glucosa-glicina y D-glucosa-L-lisina. *Rev. Soc. Quím. Perú*, 73 (4), 215-225.

- Mirdehghan, S.H. & Rahemi, M. (2007). Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. *Scientia Horticulturae*, 111, 120-127.
- Modi, P., Mihic, M. and Lewin, A. (2002). The evolving role of oral insulin in the treatment of diabetes using a novel RapidMist™ system. In: Pozzilli, P. (Ed.), *Diabetes Metabolism. Research and Reviews* (pp. 38-42). John Wiley & Sons Ltd.
- Montenegro, L., Paolino, D., Drago, R., Pignatello, R., Fresta, M. and Puglisi, G. (2006). Influence of liposome composition on *in vitro* permeation of diosmin through human *stratum corneum* and epidermis. *J. Drug Del. Sci. Tech.*, 16 (2), 133-140.
- Montero, P., Solas, T. and Pérez-Mateos, M. (2001). Pressure-induced gel properties of fish mince with ionic and non-ionic gums added. *Food Hydrocolloids*, 15 (2), 185-194.
- Montero, P., López-Caballero, M.E., Pérez-Mateos, M., Solas, M.T. and Gómez-Guillén, M.C. (2005a). Transglutaminase activity in pressure-induced gelation assisted by prior setting. *Food Chemistry*, 90, 751-758.
- Montero, P., Giménez, B., Pérez-Mateos, M. and Gómez-Guillén, M.C. (2005b). Oxidation stability of muscle with quercetin and rosemary during thermal and high-pressure gelation. *Food Chemistry*, 93, 17-23.
- Montero, P., Mosquera, M., Marín-Peñalver, D., Alemán, A., Martínez-Álvarez, O. and Gómez-Guillén, M.C. (2019). Changes in structural integrity of sodium caseinate films by the addition of nanoliposomes encapsulating an active shrimp peptide fraction. *Journal of Food Engineering*, 244, 47-54.
- Moreno, H.M., Cardoso, C., Solas, M.T. and Borderías, J.A. (2009). Improvement of cold and thermally induced gelation of giant squid (*Dosidicus gigas*) surimi. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 18 (4), 312-330.
- Moreno, H.M., Borderías, A.J. and Baron, C.P. (2010). Evaluation of some physico-chemical properties of restructured trout and hake mince during cold gelation and chilled storage. *Food Chemistry*, 120, 410-417.
- Mosquera, M.E., Giménez, M., Mallmann da Silva, I., Boelter, J.F., Montero, P., Gómez-Guillén, M.C. and Brandelli, A. (2014). Nanoencapsulation of an active peptidic fraction from sea bream scales collagen. *Food Chemistry*, 156, 144-150.
- Mosquera, M., Giménez, B., Montero, P. and Gómez-Guillén, M.C. (2016). Incorporation of liposomes containing squid tunic ACE-inhibitory peptides into fish gelatin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 769-776.
- Mozafari, M.R. (2005). Liposomes: An overview of manufacturing techniques. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 10 (4), 711-719.
- Mozafari, M.R., Johnson, C., Hatziantoniou, S. and Demetzos, C. (2008). Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *Journal of liposome research*, 18 (4), 309-327.
- Müller, R.H., Jacobs, C. and Kayser, O. (2001). Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: rationale for development and what we can expect for the future. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47 (1), 3-19.
- Murray, B.A. & FitzGerald, R.J. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: Biochemistry, bioactivity and production. *Current Pharmaceutical Design*, 13, 773-791.

- Nabet, N., Boudries, H., Chougui, N., Loupassaki, S., Souagui, S., Biulo, F., Hernández, F., Carbonell-Barrachina, A.A., Madari, K. and Larbat, R. (2017). Biological activities and secondary compound composition from *Crithmum maritimum* aerial parts. *International Journal of Food Properties*, 20 (8), 1843-1855.
- Nayak, D., Boxi, A., Ashe, S., Thathapudi, N.C. and Nayak, B. (2017). Stavudine loaded gelatin liposomes for HIV therapy: Preparation, characterization and *in vitro* cytotoxic evaluation. *Materials Sciences and Engineering C*, 73, 406-416.
- Neunert, G., Górnás, P., Dwiecki, K., Siger, A. and Polewski, K. (2015). Synergistic and antagonistic effects between alpha-tocopherol and phenolic acids in liposome system: spectroscopic study. *Eur. Food Res. Technol.*, 241, 749-757.
- Nogueira, A.O.M., De Sousa, R.S., Pereira, L.S., Mallmann, C., Ferreira, A.S., Clementin, R.M. and De Lima, V.R. (2018). Physicochemical interactions among α -eleostearic acid-loaded liposomes applied to the development of drug delivery systems. *Journal of Molecular Structure*, 1154, 248-255.
- Ogiso, T., Yamaguchi, T., Iwaki, M., Tanino, T. and Miyake, Y. (2001). Effect of positively and negatively charged liposomes on skin permeation of drugs. *J. Drug Target*, 9 (1), 49-59.
- Ohtake, S., Schebor, C. and de Pablo, J.J. (2006). Effects of trehalose on the phase behavior of DPPC-cholesterol unilamellar vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1758 (1), 65-73.
- Ojagh, S.M., Núñez-Flores, R., López-Caballero, M.E., Montero, M.P. and Gómez-Guillén, M.C. (2011). Lessening of high-pressure-induced changes in Atlantic salmon muscle by the combined use of a fish gelatin-lignin film. *Food Chemistry*, 125 (2), 595-606.
- Okonogi, S., Duangrat, C., Anuchpreeda, S., Tachakittirungrod, S. and Chowwanapoonpohn, S. (2007). Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. *Food Chemistry*, 103, 839-846.
- Olthof, M.R., Hollman, P.C. and Katan, M.B. (2001). Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *The Journal of Nutrition*, 131 (1), 66-71.
- Olmos, P., Araya-Del-Pino, A., González, C., Laso, P., Iribarra, V. y Rubio, L. (2009). Fisiopatología de la retinopatía y nefropatía diabéticas. *Rev. Méd. Chile*, 137 (10), 1375-1384.
- Orädd, G., Schmidtchen, A. and Malmsten, M. (2011). Effects of peptide hydrophobicity on its incorporation in phospholipid membranes – an NMR and ellipsometry study. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808 (1), 244-252.
- Ordóñez-Del Pazo, T., Antelo, L.T., Franco-Uriá, A., Pérez-Martín, R.I., Sotelo, C.G. and Alonso, A.A. (2014). Fish discards management in selected Spanish and Portuguese *métiers*: Identification and potential valorisation. *Trends in Food Science & Technology*, 36, 29-43.
- Ota, A., Abramovič, H., Abram, V. and Poklar Ulrih, N. (2011). Interactions of p-coumaric, caffeic and ferulic acids and their styrenes with model lipid membranes. *Food Chemistry*, 125, 1256-1261.
- Pagnussatt, F.A., de Lima, V.R., Dora, C.L., Costa, J.A.V., Putaux, J.-L. and Badiale-Furlong, E. (2016). Assessment of the encapsulation effect of phenolic compounds from *Spirulina* sp. *LEB-18* on their antifusarium activities. *Food Chemistry*, 211, 616-623.
- Pamplona, R. (2008). Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, 1777, 1249-126.

- Papahadjopoulos, D. & Miller, N. (1967). Phospholipid model membranes. I. Structural characteristics of hydrated liquid crystals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 135 (4), 624-638.
- Paredi, M.E., Pagano, M.R. and Crupkin, M. (2010). Biochemical and Physicochemical Properties of actomyosin and myofibrils from frozen stored flounder (*Paralichthys patagonicus*) fillets. *Journal of Food Biochemistry*, 34 (5), 983-997.
- Park, S.N., Jo, N.R. and Jeon, S.H. (2014). Chitosan-coated liposomes for enhanced skin permeation of resveratrol. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20 (4), 1481-1485.
- Park, Y.S. & Huang, L. (1992). Cryoprotective activity of synthetic glycerophospholipids and their interactions with trehalose. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1124, 241-248.
- Patel, V.F., Liu, F. and Brown, M.B. (2011). Advances in oral transmucosal drug delivery. *Journal of Controlled Releases*, 153, 106-116.
- Pavela, R., Maggi, F., Lupidi, G., Cianfaglione, K., Dauvergne, X., Bruno, M. and Benelli, G. (2017). Efficacy of sea fennel (*Crithmum maritimum* L., Apiaceae) essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say and *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Industrial Crops & Products*, 109, 603-610.
- Pawlikowska-Pawlega, B., Kapral, J., Gawron, A., Stochmal, A., Zuchowski, J., Pecio, L., Luchowski, R., Grudzinski, W. and Gruszecki, W.I. (2018). Interaction of a quercetin derivate – lenoside A β with liposomal membranes. *BBA-Biomembranes*, 1860, 292-299.
- Pecora, R. (2000). Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. *Journal of Nanoparticle Research*, 2 (2), 123-131.
- Peng, C.H., Chang, C.H., Peng, R.Y. and Chyau, C.C. (2010). Improved membrane transport of astaxanthin by liposomal encapsulation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 75 (2), 154-161.
- Pennington, E.R., Day, C., Parker, J.M., Barker, M. and Kennedy, A. (2016). Thermodynamics of interaction between carbohydrates and unilamellar dipalmitoyl phosphatidylcholine membranes: Evidence of dehydration and interdigitation. *J. Therm. Anal. Calorim.*, 123, 2611-2617.
- Pereira, C.G., Barreira, L., Neng, N.D.R., Nogueira, J.M.F., Marques, C., Santos, T.F., Varela, J. and Custódio, L. (2017). Searching of new sources of innovative products for the food industry within halophyte aromatic plants: *In vitro* antioxidant activity and phenolic and mineral contents of infusions and decoctions of *Crithmum maritimum* L. *Food and Chemical Toxicology*, 107, 581-589.
- Pérez-Mateos, M., Montero, P. and Gómez-Guillén, M.C. (2009). Formulation and stability of biodegradable films made from cod gelatin and sunflowers oil blends. *Food Hydrocolloids*, 23, 53-61.
- Perrier-Cornet, J.M. & Gervais, K.B. (2005). Pressure-induced shape change of phospholipid vesicles: implication of compression and phase transition. *Journal of Membrane Biology*, 204, 101-107.
- Pinheiro, A.C., Gonçalves, R.F.S., Madalena, D.A. and Vicente, A.A. (2017). Towards the understanding of behaviour of bio-based nanostructures during *in vitro* digestion. *Current Opinion in Food Science*, 15, 79-86.

- Pham-Huy, L.A., He, H. and Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int. J. Biomed.Sci.*, 4 (2), 89-96.
- Popova, A.V. & Hinch, D.K. (2016). Effects of flavonol glycosides on liposome stability during freezing and drying. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 1858, 3050-3060.
- Porfire, A., Muntean, D.M., Rus, L., Sylvester, B. and Tomuță, I. (2017). A quality by design approach for the development of lyophilized liposomes with simvastatin. *Saudi Pharm J.*, 25 (7), 981-992.
- Porrini, M. & Riso, P. (2008). Factors influencing the bioavailability of antioxidants in foods: A critical appraisal. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 18 (10), 647-650.
- Prakash, B., Kujur, A., Yadav, A., Kumar, A., Singh, P.P. and Dubey, N.K. (2018). Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oil in food system. *Food Control*, 89, 1-11.
- Pu, C. & Tang, W. (2017). The antibacterial and antibiofilm efficacies of a liposomal peptide originating from rice bran protein against *Listeria monocytogenes*. *Food & Function*, 8, 4159-4169.
- Qian, Z.-J., Jung, W.-K. and Kim, S.-K. (2008). Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. *Bioresource technology*, 99 (6), 1690-1698.
- Quan, W., Tao, Y., Lu, M., Yuan, B., Chen, J., Zeng, M., Qin, F., Guo, F. and He, Z. (2018). Stability of the phenolic compounds and antioxidant capacity of five fruit (apple, orange, grape, pomelo and kiwi) juices during *in vitro*-simulated gastrointestinal digestion. *International Journal of Food Science and Technology*, 53, 1131-1139.
- Quirós, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M.A., Miguel, M., Aleixandre, A. and Recio, I. (2007). Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *International Dairy Journal*, 17, 33-41.
- Ramdath, D.D., Padhi, E.M.T., Sarfaraz, S., Renwick, S. and Duncan, A.M. (2017). Beyond the cholesterol-lowering effect of soy protein: a review of the effects of dietary soy and its constituents on risk factors for cardiovascular disease. *Nutrients*, 9 (4), 324.
- Ramezanzade, L., Hosseini, S.F. and Nikkhah, M. (2017). Biopolymer-coated nanoliposomes as carriers of rainbow trout skin-derived antioxidant peptides. *Food Chem.*, 234, 220-229.
- Rangelov, S., Momekova, D. and Almgren, M. (2010). Structural characterization of lipid-based colloidal dispersions using cryogenic transmission electron microscopy. In: Méndez-Vilas, A. & Díaz, J. (Vol. Eds.). *FORMATEX microscopy series no. 4. Vol. 3. Microscopy: Science, technology, applications and education* (pp. 1724-1734). Badajoz, Spain.
- Rashidinejad, A., Birch, E.J., Sun-Waterhouse, D. and Everett, D.W. (2014). Delivery of green tea catechin and epigallocatechin gallate in liposomes incorporated into low-fat hard cheese. *Food Chemistry*, 156, 176-183.
- Rasoulboroujeni, M., Kupgan, G., Moghadam, F., Tahriri, M., Boughdachi, A., Khoshkenar, P., Ambrose, J.J., Kiaie, N., Vashae, D., Ramsey, J.D. and Tayebi, L. (2017). Development of DNA-liposome complex for gene delivery applications. *Materials Science and Engineering C*, 75, 191-197.

- Ratnam, D.V., Ankola, D.D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K. and Kumar, M.N.V.R. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, 113 (3), 189-207.
- Ratti, C. (2001). Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. *Journal of Food Engineering*, 49, 311-319.
- Rechner, A.R., Smith, M.A., Kuhnle, G., Gibson, G.R., Debnam, E.S., Srai, S.K.S., Moore, K.P. and Rice-Evans, C. (2004). Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radical Biology & Medicine*, 36 (2), 212-225.
- Renna, M., Gonnella, M., Caretto, S., Mita, G. and Serio, F. (2017). Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.): from underutilized crop to new dried product for food use. *Genet. Resour. Crop Evol.*, 64, 205-216.
- Requena, T., Monagas, M., Pozo-Bayón, M.A., Martín-Álvarez, P.J., Bartolomé, B., del Campo, R.; Ávila, M., Martínez-Cesta, M.C., Peláez, C. and Moreno-Arribas, M.V. (2010). Perspectives of the potential implications of wine polyphenols on human oral and gut microbiota. *Trends in Food Science and Technology*, 21 (7), 332-344.
- Rigaldie, Y., Largeteau, A., Lemagnen, G., Ibalot, F., Pardon, P., Demazeau, G. and Grislain, L. (2003). Effects of High Hydrostatic Pressure on Several Sensitive Therapeutic Molecules and a Soft Nanodispersed Drug Delivery System. *Pharmaceutical Research*, 20 (12), 2036-2040.
- Ringstad, L., Protopapa, E., Lindholm-Sethson, B., Schmidtchen, A., Nelson, A. and Malmsten, M. (2008). An electrochemical study into the interaction between complement-derived peptides and DOPC mono- and bilayers. *Langmuir*, 24 (1), 208-216.
- Rodsamran, P. & Sothornvit, R. (2018). Microencapsulation of Thai rice grass (*O. sativa* cv. Khao Dawk Mali 105) extract incorporated to form bioactive carboxymethyl cellulose edible film. *Food Chemistry*, 242, 239-246.
- Rojas-Graü, M.A., Raybaudi-Massilia, R.M., Soliva-Fortuny, R.C., Avena-Bustillos, R.J., McHugh, T.H. and Martín-Belloso, O. (2007). Apple puree-alginate edible coating as carrier of antimicrobial agents to prolong shelf-life of fresh-cut apples. *Postharvest Biology and Technology*, 45 (2), 254-264.
- Rosenblat, M., Volkova, N., Coleman, R. and Aviram, M. (2006). Pomegranate byproduct administration to apolipoprotein E-deficient mice attenuates atherosclerosis development as a result of decreased macrophage oxidative stress and reduced cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 1928- 1935.
- Sánchez-Alonso, I., Martínez, I., Sánchez-Valencia, J. and Careche, M. (2012). Estimation of freezing storage time and quality changes in hake (*Merluccius*, L.) by low field NMR. *Food Chemistry*, 135, 1626-1634.
- Sánchez-Alonso, I., Moreno, P. and Careche, M. (2014). Low field nuclear magnetic resonance (LF-NMR) relaxometry in hake (*Merluccius*, L.) muscle after different freezing and storage conditions. *Food Chemistry*, 153, 250-257.
- Sandri, G., Rossi, S., Ferrari, F., Bonferroni, M.C. and Caramella, C.M. (2015). Mucoadhesive Polymers as Enabling Excipients for Oral Mucosal Drug Delivery. Oral Mucosal Drug Delivery and Therapy Chapter 4, pp 53-88. In: Rathbone, M.J., Senel, S. and Pather, I. (Eds.). *Advances in Delivery Science and Technology book series (ADST)*. ISSN: 2192-6204. Springer.

- Sangsuriyawong, A., Limpawattana, M., Siriwan, D. and Klaypradit, W. (2019). Properties and bioavailability assessment of shrimp astaxanthin loaded liposomes. *Food Sci. Biotechnol.*, 28 (2), 529-537.
- Sathivel, S. (2005). Chitosan and protein coatings affect yield, moisture loss and lipid oxidation of Pink Salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) fillets during frozen storage. *Journal of Food Science*, 70, 455-459.
- Sayari, N., Sila, A., Haddar, A., Balti, R., Ellouz-Chaabouni, S. and Bougatef, A. (2016). Valorisation of smooth hound (*Mustelus mustelus*) waste biomass through recovery of functional, antioxidative and antihypertensive bioactive peptides. *Environmental Science and Pollution Research*, 23 (1), 366-376.
- Scalbert, A. & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 130 (8S), 2073S-2085S.
- Scherbl, D., Muentnich, S. and Richling, E. (2014). *In vitro* absorption studies of chlorogenic acids from coffee using the Ussing chamber model. *Food Research International*, 63 (Part C), 456-463.
- Schultz, N., Metreveli, G., Franzreb, M., Frimmel, F.H. and Syldatk, C. (2008). Zeta potential measurement as a diagnostic tool in enzyme immobilisation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 66 (1), 39-44.
- Sebaaly, C., Jraij, A., Fessi, H., Charcosset, C. and Greige-Gerges, H. (2015). Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. *Food Chemistry*, 178, 52-62.
- Sebaaly, C., Greige-Gerges, H., Stainmesse, S., Fessi, H. and Charcosset, C. (2016). Effect of composition, hydrogenation of phospholipids and lyophilisation on the characteristics of eugenol-loaded liposomes prepared by the ethanol injection method. *Food Bioscience*, 15, 1-10.
- Semenova, M.G., Antipova, A.S., Zelikina, D.V., Martirosova, E.I., Plashchina, I.G., Palmina, N.P., Binyukov, V.I., Bogdanova, N.G., Kasparov, V.V., Shumilina, E.A. and Ozerova, N.S. (2016). Biopolymer nanovehicles for essential polyunsaturated fatty acids: Structure-functionality relationships. *Food Res. Int.*, 88, 70-78.
- Sen, R., Sahoo, S.K. and Satpathy, S. (2014). Liposomes as drug delivery system: a brief review. *Int. J. Res. Pharm. Sci.*, 5 (4), 309-321.
- Senatore, F., Napolitano, F. and Ozcan, M. (2000). Composition and antibacterial activity of the essential oil from *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae) growing wild in Turkey. *Flavour and fragrance journal*, 15 (3), 186-189.
- Sengul, H., Surek, E. and Nilufer-Erdil, D. (2014). Investigating the effects of food matrix and food components on bioaccessibility of pomegranate (*Punica granatum*) phenolics and anthocyanins using an in-vitro gastrointestinal digestion model. *Food Research International*, 62, 1069-1079.
- Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S.Y., Sood, A.K. and Hua, S. (2015). Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 286.
- Sharma, A. & Sharma, U.S. (1997). Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*, 154, 123-140.
- Sikorski, Z.E. & Kolakowska, A. (2003). Chemical and functional properties of food lipids. New York: CRC Press.
- Sila, A., Martinez-Alvarez, O., Haddar, A., Gómez-Guillén, M.C., Nasri, M., Montero, M.P. and Bougatef, A. (2015). Recovery, viscoelastic and functional properties of Barbel skin gelatine:

- Investigation of anti-DPP-IV and anti-prolyl endopeptidase activities of generated gelatine polypeptides. *Food Chemistry*, 168, 478-486.
- Silva, B.M.A., Borges, A.F., Silva, C.C., Coelho, J.F.L. and Simões, S. (2015). Mucoadhesive oral films: The potential for unmet needs. *International Journal of Pharmaceutics*, 494, 537–551.
- Silva, R., Ferreira, H., Little, C. and Cavaco-Paulo, A. (2010). Effect of ultrasound parameters for unilamellar liposome preparation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17 (3), 628–632.
- Silva-Weiss, A., Quilaqueo, M., Venegas, O., Ahumada, M., Silva, W., Osorio, F. and Giménez, B. (2018). Design of dipalmitoyl lecithin liposomes loaded with quercetin and rutin and their release kinetics from carboxymethyl cellulose edible films. *Journal of Food Engineering*, 224, 165-173.
- Simões, L.S., Madalena, D.A., Pinheiro, A.C., Teixeira, J.A., Vicente, A.A. and Ramos, O.L. (2017). Micro- and nano bio-based delivery systems for food applications: *In vitro* behaviour. *Advances in Colloid and Interface Science*, 243, 23-45.
- Singh, H. (2016). Nanotechnology applications in functional foods; Opportunities and challenges. *Prev. Nutr. Food Sci.*, 21, 1-8.
- Siracusa, L., Kulisic-Bilusic, T., Politeo, O., Krause, I., Dejanovic, B. and Ruberto, G. (2011). Phenolic composition and antioxidant activity of aqueous infusions from *Capparis spinosa* L. and *Crithmum maritimum* L. before and after submission to a two-step *in vitro* digestion model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 12453-12459.
- Slinkard, K. & Singleton, V.L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28 (1), 49–55.
- Souza, B.W.S., Cerqueira, M.A., Casariego, A., Lima, A.M.P., Teixeira, J.A. and Vicente, A.A. (2009). Effect of moderate electric fields in the permeation properties of chitosan coatings. *Food Hydrocolloids*, 23 (8), 2110-2115.
- Sowmya, R., Rathinaraj, K. and Sachindra, N.M. (2011). An autolytic process for recovery of antioxidant activity rich carotenoprotein from shrimp heads. *Mar Biotechnol.*, 13, 918-927.
- Sowmya, R. & Sachindra, N.M. (2012). Evaluation of antioxidant activity of carotenoid extract from shrimp processing byproducts by *in vitro* assays and in membrane model system. *Food Chemistry*, 134, 308-314.
- Stalmach, A., Mullen, W., Barron, D., Uchida, K., Yokota, T., Cavin, C., Steiling, H., Williamson, G. and Crozier, A. (2009). Metabolite profiling of hydroxycinnamate derivatives in plasma and urine after the ingestion of coffee by humans: identification of biomarkers of coffee consumption. *Drug Metabolism & Disposition*, 37 (8), 1749-1758.
- Stark, B., Pabst, G. and Prassl, R. (2010). Long-term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze-drying: effects of cryoprotectants on structure. *Eur. J. Pharmaceut. Sci.*, 41 (3-4), 546-555.
- Suklim, K., Flick Jr, G.J., Marcy, J.E. and Eigel, W.N. (2003). Effect of Starch and Egg White Albumin on the Textural and Cooking Properties of Restructured Squid Patties (*Illex illecebrosus*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 12 (2), 47-60.
- Sułkowski, W.W., Pentak, D., Nowak, K. and Sułkowska, A. (2005). The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability. *J. Mol. Struct.*, 744-747, 737-747.

- Sun, Y.-Q., Tao, X., Men, X.-M., Xu, Z.-W. and Wang, T. (2017). *In vitro* and *in vivo* antioxidant activities of three major polyphenolic compounds in pomegranate peel: Ellagic acid, punicalin and punicalagin. *Journal of Integrative Agriculture*, 16 (8), 1808-1818.
- Surek, E. & Nilufer-Erdil, D. (2016). Phenolic contents, antioxidant activities and potential bioaccessibilities of industrial pomegranate nectar processing wastes. *International Journal of Food Science and Technology*, 51 (1), 231–239.
- Svetlovics, J.A., Wheaten, S.A. and Almeida, P.F. (2012). Phase separation and fluctuations in mixtures of a saturated and an unsaturated phospholipid. *Biophysical Journal*, 102, 2526-2535.
- Tabaraki, R., Heidarizadi, E. and Benvidi, A. (2012). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel antioxidants by response surface methodology. *Sep. Purif. Technol.*, 98, 16-23.
- Tachaprutinuna, A., Udomsup, T., Luadthong, C. and Wanichwecharungruang, S. (2009). Preventing the thermal degradation of astaxanthin through nanoencapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 374, 119–124.
- Tai, K., He, X., Yuan, X., Meng, K., Gao, Y. and Yuan, F. (2017). A comparison of physicochemical and functional properties of icaritin-loaded liposomes based on different surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 518, 218-231.
- Tan, C., Xia, S., Xue, J., Xie, J., Feng, B. and Zhang, X. (2013). Liposomes as vehicles for lutein: preparation, stability, liposomal membrane dynamics, and structure. *J. Agric. Food Chem.*, 61, 8175-8184.
- Tan, C., Xue, J., Lou, X., Abbas, S., Guan, Y., Feng, B., Zhang, X. and Xia, S. (2014). Liposomes as delivery systems for carotenoids: Comparative studies of loading ability, storage stability and *in vitro* release. *Food and Function*, 5, 1232–1240.
- Tang, W.-L., Tang, W.-H., Chen, W.C., Diako, C., Ross, C.F. and Li, S.-D. (2017). Development of a rapidly dissolvable oral pediatric formulation for mefloquine using liposomes. *Molecular Pharmaceutics*, 14, 1969-1979.
- Taylor, T.M., Bruce, B.D., Weiss, J. and Davidson, P.M. (2008). *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 inhibition *in vitro* by liposome-encapsulated nisin and ethylene diaminetetraacetic acid. *Journal of Food Safety*, 28 (2), 183-197.
- Taylor, T.M., Gaysinsky, S., Davidson, P.M., Bruce, B.D. and Weiss, J. (2007). Characterization of antimicrobial-bearing liposomes by ζ -potential, vesicle size and encapsulation efficiency. *Food Biophysics*, 2, 1-9.
- Taylor, K.M.G. & Morris, R.M. (1995). Thermal analysis of phase transition behaviour in liposomes. *Thermochimica Acta*, 248 (C), 289-301.
- Telang, A.M. & Thorat, B.N. (2010). Optimization of Process Parameters for Spray Drying of Fermented Soy Milk. *Drying Technology*, 28 (12), 1445-1456.
- Tharanathan, R.N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science and Technology*, 14, 71-78.
- Tokton, N., Ounaroorn, A., Panichayupakaranant, P. and Tiyafoonchai, W. (2014). Development of ellagic acid rich pomegranate peel extract loaded nanostructured lipid carriers (NLCs). *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 6 (4), 259-265.

- Tomás-Barberán, F.A., González-Sarriás, A., García-Villalba, R., Núñez-Sánchez, M.A., Selma, M.V., García-Conesa, M.T. and Espín, J.C. (2017). Urolithins, the rescue of “old” metabolites to understand a “new” concept: Metabotypes as a nexus among phenolic metabolism, microbiota dysbiosis, and host health status. *Mol. Nutr. Food Res.*, 61 (1), 1500901.
- Toniazzo, T., Peres, M.S., Ramos, A.P. and Pinho, S.C. (2017). Encapsulation of quercetin in liposomes by ethanol injection and physicochemical characterization of dispersions and lyophilized vesicles. *Food Bioscience*, 19, 17-25.
- Toyran, N. & Severcan, F. (2003). Competitive effect of vitamin D₂ and Ca²⁺ on phospholipid model membranes: an FTIR study. *Chem. Phys. Lipids*, 123 (2), 165-176.
- Tripathi, A.K. & Misra, A.K. (2005). Soybean - A consummate functional food: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 42 (2), 111-119.
- Tulipano, G., Sibilia, V., Caroli, A.M. and Cocchi, D. (2011). Whey proteins as sources of dipeptidyl dipeptidase IV (dipeptidyl dipeptidase-4) inhibitors. *Peptides*, 32 (4), 835-838.
- Ueki, N., Wan, J. and Watabe, S. (2014). The Pepsin Digestibility of Thermal Gel Products Made from White Croaker (*Pennahia argentata*) Muscle in Associating with Myosin Polymerization Levels. *Journal of Food Science*, 79 (12), C2427–C2433.
- Unión Europea. Reglamento (UE) 116/2010 de la Comisión, de 9 de Febrero de 2010, por el que se modifica el Reglamento (CE) 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a la lista de declaraciones nutricionales. *Diario oficial de la Unión Europea*, 10 de Febrero de 2010, pp. 16-18.
- Unión Europea. Reglamento (UE) 432/2012 de la Comisión, de 16 de Mayo de 2012, por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños. *Diario oficial de la Unión Europea*, 25 de Mayo de 2012, pp. 1-40.
- Unión Europea. Reglamento (UE) 2015/2283 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de Noviembre de 2015, relativo a los nuevos alimentos, por el que se modifica el Reglamento (UE) nº 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo y se derogan el Reglamento (CE) nº 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) nº 1852/2001 de la Comisión. *Diario oficial de la Unión Europea*, 11 de Diciembre de 2015, 327, pp. 1-22.
- Valencia-Sullca, C., Jiménez, M., Jiménez, A., Atarés, L., Vargas, M. and Chiralt, A. (2016). Influence of liposome encapsulated essential oils on properties of chitosan films. *Polym. Int.*, 65, 979-987.
- Van Hoogevest, P. & Wendel, A. (2014). The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116 (9), 1088-1107.
- Van Winden, E.C.A., Zhang, W. and Crommelin, D.J.A. (1997). Effect of freezing rate on the stability of liposomes during freeze-drying and rehydration. *Pharmaceutical Research*, 14 (9), 1151–1160.
- Vate, N.K. & Benjakul, S. (2016). Combined effect of squid ink tyrosinase and tannic acid on heat induced aggregation of natural actomyosin from sardine. *Food Hydrocolloids*, 56, 62-70.

- Vázquez-Araújo, L., Chambers IV, E., Adhikari, K. and Carbonell-Barrachina, A.A. (2011). Physico-chemical and sensory properties of pomegranate juices with pomegranate albedo and carpellar membranes homogenate. *LWT-Food Science and Technology*, 44, 2119-2125.
- Vitonyte, J., Manca, M.L., Caddeo, C., Valenti, D., Peris, J.E., Usach, I., Nacher, A., Matos, M., Gutiérrez, G., Orrù, G., Fernández-Busquets, X., Fadda, A.M. and Manconi, M. (2017). Bifunctional viscous nanovesicles co-loaded with resveratrol and gallic acid for skin protection against microbial and oxidative injuries. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 114, 278-287.
- Volpe, R. & Solis, G. (2015). Nutraceuticals: Definition and Epidemiological Rationale for Their Use in Clinical Practice. *High Blood Press Cardiovasc. Prev.*, 22, 199-201.
- Wang, T. & Briggs, J.L. (2002). Rheological and thermal properties of soybean oils with modified FA compositions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79 (8), 831-836.
- Wang, J., Guo, F., Ma, M., Lei, M., Tan, F. and Li, N. (2014). Nanovesicular system containing tretinoin for dermal targeting delivery and rosacea treatment: a comparison of hexosomes, glycosomes and ethosomes. *RSC Adv.*, 4, 45458-45466.
- Wang, L., Hu, X., Shen, B., Xie, Y., Shen, C., Lu, Y., Qi, J., Yuan, H. and Wu, W. (2015). Enhanced stability of liposomes against solidification stress during freeze-drying and spray-drying by coating with calcium alginate. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 30, 163-170.
- Wang, G. & Wang, T. (2008). Oxidative stability of egg and soy lecithin as affected by transition metal ions and pH in emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (23), 11424-11431.
- Wayno, P., Kaewseejan, N. and Siriamornpun, S. (2016). Bioactive compounds and antioxidant properties of different solvent extracts derived from Thai rice by-products. *Applied Biological Chemistry*, 59 (3), 373-384.
- Wei, W., Hu, W., Zhang, X.-Y., Zhang, F.-P., Sun, S.-Q., Liu, Y. and Xu, C.-H. (2018). Analysis of protein structure changes and quality regulation of surimi during gelation based on infrared spectroscopy and microscopic imaging. *Scientific Reports*, 8:5566, DOI: 10.1038/s41598-018-23645-3.
- Were, L.M., Bruce, B.D., Davidsin, P. and Weiss, J. (2003). Size, Stability and Entrapment Efficiency of phospholipid nanocapsules containing polypeptide antimicrobials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (27), 8073-8079.
- Wergedahl, H., Liaset, B., Gudbrandsen, O.A., Lied, E., Espe, M., Muna, Z., Mork, S. and Berge, R.K. (2004). Fish protein hydrolysate reduces plasma total cholesterol, increases the proportion of HDL cholesterol, and lowers acyl-CoA: cholesterol acyltransferase activity in liver of Zucker rats. *J. Nutr.*, 134 (6), 1320-1327.
- Wolkers, W.F., Oldenhof, H. and Glasmacher, B. (2010). Dehydrating phospholipid vesicles measured in real-time using ATR Fourier transform infrared spectroscopy. *Cryobiology*, 61 (1), 108-114.
- Wu, J., Aluko, R.E. and Muir, A.D. (2002). Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions. *Journal of Chromatography A*, 950 (1-2), 125-130.
- Wu, J., Liu, H., Ge, S., Wang, S., Qin, Z., Chen, L., Zheng, Q., Liu, Q. and Zhang, Q. (2015). The preparation, characterization, antimicrobial stability and *in vitro* release evaluation of fish

- gelatin films incorporated with cinnamon essential oil nanoliposomes. *Food Hydrocolloids*, 43, 427-435.
- Wu, H., Zhang, Z., Huang, H. and Li, Z. (2017). Health benefits of soy and soy phytochemicals. *AME Medical Journal*, 2 (162), doi: 10.21037/amj.2017.10.04.
- Yan, X., Li, H., Xu, J. and Zhou, C. (2010) Analysis of phospholipids in microalga *Nitzschia closterium* by UPLC-Q-TOF-MS. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 28: 106-112.
- Yang, S., Liu, C., Liu, W., Yu, H., Zheng, H., Zhou, W. and Hu, Y. (2013). Preparation and Characterization of Nanoliposomes Entrapping Medium-Chain Fatty Acids and Vitamin C by Lyophilization. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 19763-19773.
- Yang, F., Oyeyinka, S.A., Xu, W., Ma, Y. and Zhou, S. (2018). *In vitro* bioaccessibility and physicochemical properties of phytosterol linoleic ester synthesized from soybean sterol and linoleic acid. *LWT-Food Science and Technology*, 92, 265-271.
- Yazbeck, R., Howarth, G.S. and Abbott, C.A. (2009). Dipeptidyl peptidase inhibitors, an emerging drug class for inflammatory disease? *Trends in pharmacological sciences*, 30 (11), 600-607.
- Ye, T., Yu, J., Luo, Q., Wang, S. and Chan, H.K. (2017). Inhalable clarithromycin liposomal dry powders using ultrasonic spray freeze-drying. *Powder Technology*, 305, 63-70.
- Ye, Q., Georges, N. and Selomulya, C. (2018). Microencapsulation of active ingredients in functional foods: From research stage to commercial food products. *Trends in Food Science & Technology*, 78, 167-179.
- Yokota, D., Moraes, M. and Pinho, S.C. (2012). Characterization of lyophilized liposomes produced with non-purified soy lecithin: a case study of casein hydrolysate microencapsulation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 29 (2), 325-335.
- Yuan, X. & Zhao, W. (2016). Processing and trade. In: Yuan, X. & Zhao, W. (Eds.). *China fisheries statistics yearbook* (pp. 95-96). Beijing: Chinese Agricultural Press (In Chinese).
- Yücel, Ç. & Şeker-Karatoprak, G. (2017). Development and evaluation of the antioxidant activity of liposomes and nanospheres containing rosmarinic acid. *Farmacia*, 65 (1), 40-45.
- Zhang, H., Yokoyama, W.H. and Zhang, H. (2012). Concentration-dependent displacement of cholesterol in micelles by hydrophobic rice bran protein hydrolysates. *J. Sci. Food Agricultural*, 92, 1395-1401.
- Zhou, L.S. & Li-Chan, E.C.Y. (2009). Effects of *Kudoa* spores, endogenous protease activity and frozen storage on cooked texture of minced Pacific hake (*Merluccius productus*). *Food Chemistry*, 113 (4), 1076-1082.
- Zhu, Y., You, X., Huang, K., Raza, F., Lu, X., Chen, Y., Dhinakar, A., Zhang, Y., Kang, Y., Wu, J. and Ge, L. (2018). Effect of taste masking technology on fast dissolving oral film: dissolution rate and bioavailability. *Nanotechnology*, 29 (30), 1-12.
- Zoghi, A., Khosravi-Darani, K. and Omri, A. (2016). Process variables and design of experiments in liposome and nanoliposome research. *Mini-Reviews in Medical Chemistry*, 16 (1), 1-16.
- Zulueta, A., Esteve, M. J., and Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114 (1), 310-316.
- Zweers, M.L.T., Grijpma, D.W., Engbers, G.H.M. and Feijen, J. (2003). The preparation of monodisperse biodegradable polyester nanoparticles with a controlled size. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 66B (2), 559-566.

12. ANEXO

Food Research International 100 (2017) 541–550



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres

Effect of chemical composition and sonication procedure on properties of food-grade soy lecithin liposomes with added glycerol



D. Taladrid, D. Marín, A. Alemán, I. Álvarez-Acero, P. Montero, M.C. Gómez-Guillén*

Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), José Antonio Novais 10, 28040 Madrid, Spain<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.052>

Received 24 May 2017; Received in revised form 21 July 2017; Accepted 22 July 2017

Available online 24 July 2017

0963-9969/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Food Chemistry 245 (2018) 525–535



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Freeze-dried phosphatidylcholine liposomes encapsulating various antioxidant extracts from natural waste as functional ingredients in surimi gels



D. Marín, A. Alemán, A. Sánchez-Faure, P. Montero, M.C. Gómez-Guillén*

Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), José Antonio Novais 10, 28040 Madrid, Spain<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.141>

Received 6 July 2017; Received in revised form 24 October 2017; Accepted 29 October 2017

Available online 31 October 2017

0308-8146/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Journal of Food Engineering 223 (2018) 132–143



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Food Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jfoodeng



Encapsulation of food waste compounds in soy phosphatidylcholine liposomes: Effect of freeze-drying, storage stability and functional aptitude



D. Marín, A. Alemán, P. Montero, M.C. Gómez-Guillén*

Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), C/ José Antonio Novais 10, 28040, Madrid, Spain

Received 2 November 2017

Received in revised form

15 December 2017

Accepted 16 December 2017

<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.12.009>

Available online 20 December 2017 0260-8774/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

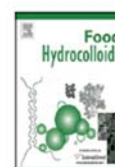
Food Hydrocolloids 82 (2018) 466–477



Contents lists available at ScienceDirect

Food Hydrocolloids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodhyd



Protein aggregation, water binding and thermal gelation of salt-ground hake muscle in the presence of wet and dried soy phosphatidylcholine liposomes



D. Marín, A. Alemán, P. Montero, M.C. Gómez-Guillén*

Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), José Antonio Novais 10, 28040 Madrid, Spain

Received 19 December 2017

Received in revised form

26 March 2018

Accepted 12 April 2018

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.04.025>

Available online 17 April 2018 0268-005X/© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

LWT - Food Science and Technology 98 (2018) 46–53



Contents lists available at ScienceDirect

LWT - Food Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lwt

Gelling properties of hake muscle with addition of freeze-thawed and freeze-dried soy phosphatidylcholine liposomes protected with trehalose[☆]

D. Marín-Peñalver, A. Alemán, P. Montero, M.C. Gómez-Guillén^{*}*Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), José Antonio Novais 10, 28040, Madrid, Spain*<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.018>

Received 6 March 2018; Received in revised form 5 August 2018; Accepted 8 August 2018

Available online 09 August 2018

0023-6438/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Journal of Food Engineering 244 (2019) 47–54



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Food Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jfoodeng

Changes in structural integrity of sodium caseinate films by the addition of nanoliposomes encapsulating an active shrimp peptide fraction[☆]

Pilar Montero, Mauricio Mosquera, Daniel Marín-Peñalver, Ailén Alemán,
Óscar Martínez-Álvarez, M. Carmen Gómez-Guillén^{*}*Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), José Antonio Novais 10, Ciudad Universitaria, 28040, Madrid, Spain*<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.09.024>

Received 5 June 2018; Received in revised form 14 September 2018; Accepted 15 September 2018

Available online 17 September 2018

0260-8774/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Food Research International 119 (2019) 665–674



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres



Encapsulation of antioxidant sea fennel (*Crithmum maritimum*) aqueous and ethanolic extracts in freeze-dried soy phosphatidylcholine liposomes



Ailén Alemán, Daniel Marín, Diego Taladrid, Pilar Montero, M. Carmen Gómez-Guillén*

Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), C/José Antonio Novais 10, Madrid 28040, Spain

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.044>

Received 5 May 2018; Received in revised form 9 October 2018; Accepted 11 October 2018

Available online 12 October 2018

0963-9969/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

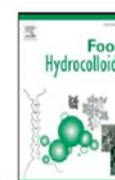
Food Hydrocolloids 94 (2019) 553–560



Contents lists available at ScienceDirect

Food Hydrocolloids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodhyd



Carboxymethyl cellulose films containing nanoliposomes loaded with an angiotensin-converting enzyme inhibitory collagen hydrolysate



D. Marín-Peñalver, A. Alemán, M.C. Gómez-Guillén*, P. Montero

Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), C/ José Antonio Novais 10, 28040, Madrid, Spain

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.009>

Received 30 January 2019; Received in revised form 23 March 2019; Accepted 2 April 2019

Available online 03 April 2019

0268-005X/ © 2019 Published by Elsevier Ltd.

